

REBECA NAMBUMBO LUACUTI

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR DE POTENCIAL
TRANSITÓRIO VANILOIDE TIPO 1 (TRPV1) EM UM
MODELO DE SÍNDROME DE DOR AGUDA INDUZIDA POR
PACLITAXEL EM RATOS**

Dissertação Apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção
do título de Mestre em Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gabriela
Trevisan

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L926p Luacuti,Rebeca Nambumbo.

Participação do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) em um modelo de síndrome de dor aguda induzida por paclitaxel em ratos / Rebeca Nambumbo Luacuti ; orientadora : Gabriela Trevisan. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2015.

92 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2015.

1. Dor - Tratamento. 2. Paclitaxel - Administração.
3. Receptor de potencial transitório vanilóide Tipo 1.
4. Dor neuropática. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.0472

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.

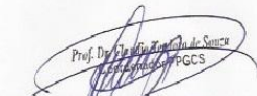
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

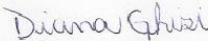
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 242

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia 16 (dezesesseis) do mês de novembro de 2015 (dois mil e quinze), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Rebeca Nambumbo Luacuti**, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Gabriela Trevisan dos Santos, intitulada **“Participação do receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (trpv1) em um modelo de síndrome de dor aguda induzida por paclitaxel em ratos”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada; Prof.^a Dr.^a Sara Marchesan Oliveira (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) – Conceito final: Aprovada e Prof.^a Dr.^a Vanessa Moraes de Andrade (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 15h30 (quinze horas e trinta minutos), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza Coordenador do Programa. Criciúma, 16 (dezesesseis) de novembro de 2015 (dois mil e quinze).


Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense, bem como na Universidade Federal de Santa Maria, no Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia.

*Dedico este trabalho aos meus
filhos pelo amor e apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pai todo-poderoso pela vida, saúde e bênçãos que me tem proporcionado todos os dias de minha vida.

Aos meus pais, Elias Luacuti e Dêbora Essoco, que me criaram com amor, dedicação iluminando o meu caminho e por me ensinarem o valor do questionamento e do conhecimento; a vós, serei grata eternamente.

Também aos meus diamantes: Albino, Elias, José e Marta com quem partilho minha vida, eu agradeço pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência durante a confecção desta tese e porque vocês são a linda família que Deus me deu; aí está a razão do meu viver, sem esquecer o Paulo George de Araújo por cuidar dos nossos filhos.

Aos meus irmãos Mateus, Silva, Filipe, Lurdes, Felismina, Judith, Clara, Queila e a todos outros eu agradeço a Deus por ter uma família onde encontro paz, amor, companheirismo, alegrias, e principalmente coerência para fortalecer os verdadeiros valores da vida, mas sobretudo por ele me ter dado a capacidade de perceber a família encantadora que tenho; obrigada a cada um de vocês. A mãe Dêbora Chinossanda pelo apoio incondicional que sempre me tem proporcionado, a minha cunhada Benvenida Segunda, as amigas, Kalú, Mônica Martins, Alzira Nacongo e ao amigo Xavier João por estarem sempre por perto e disponíveis para qualquer tipo de apoio prestado a mim e a minha família durante esta formação.

Não esquecendo o meu conselheiro, compadre e irmão Adolfo Elias Gomes. Tenho a agradecer o professor Dr. Hélder Lucas Chipindo pelo estímulo e confiança que me conferiu, mostrando que a maneira sábia de ajudar alguém é por meio de seu próprio exemplo.

Muito especificamente tenho a agradecer a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gabriela Trevisan por me ter aceite como sua orientanda, com todo amor, carinho, compreensão, quanto aos primeiros passos na área de pesquisa e pela paciência e dedicação que teve durante esta jornada, sem medir esforços para que este sonho se tornasse realidade, foi um privilégio ser tua orientanda e mais que uma orientadora tu foste como uma irmã pra mim, obrigada por tudo e que Deus te abençoe.

A Dr^a. Flávia Rigo, que foi como co-orientadora, companheira, amiga e irmã, eu agradeço pela força e pré-disposição permanente e contínua que tiveste em prestar ajuda quanto aos meus questionamentos durante os momentos de pesquisa.

Felizmente durante esta caminhada estiveram sempre presente pessoas que não temos laços consanguíneos, mas que se tornaram minha família de coração, contribuindo com um processo de muito aconchego, risadas, lágrimas, trabalho e dedicação, são eles: A família Filipe, os colegas e companheiros de luta: Angelino, Olga, Edna e Orlando. Aos amigos: Silvestre, Ricardo e ao meu anjo da guarda Margarida Hossi (Tunicha), sempre bem-disposta ao meu lado em ajudar com o que der e vier, sem medir esforços nem tempo a ti serei eternamente grata meu amor, te amo minha... Aos meus irmãos espirituais pelas orações de conforto, apoio moral e material desde a primeira hora que me apresentei a igreja Batista Betel, que estes irmãos foram incansáveis, especialmente a família do irmão Ivan e da irmã Nívea, que Deus os abençoe...

E, de uma maneira geral agradeço a toda família, colegas e amigos que de forma direta ou indireta envidaram todo seu esforço para que este sonho se tornasse realidade.

Por fim agradeço, o laboratório de biologia molecular e celular (LABIM), a Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e em particular os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde (PPGCS) pelos ensinamentos.

*“Suba o primeiro degrau com fé.
Você não tem que ver toda a
escada.
Você só precisa dar o primeiro
passo”.*

Martin Luther King Jr.

RESUMO

O uso clínico do paclitaxel (PAC) como agente quimioterápico é limitado pelos seus efeitos adversos, especialmente a indução de dor. Embora seja bem conhecido que o tratamento prolongado com o paclitaxel poderia levar à dor neuropática, a administração única de PAC também pode provocar uma síndrome de dor aguda, o que se acredita ser causada pela sensibilização de nociceptores. O receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) é expresso principalmente nos nociceptores, onde desempenha um papel chave na detecção de vários estímulos dolorosos nocivos. O TRPV1 foi implicado no desenvolvimento da dor neuropática induzida pelo PAC, mas o seu papel na síndrome da dor aguda relacionada com o PAC é desconhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi observar a participação do canal TRPV1 em um modelo de síndrome de dor aguda induzida por PAC em ratos. Para isso foram utilizados ratos Wistar machos (200-300g). O modelo de síndrome de dor aguda utilizado foi a administração de PAC intraperitoneal (1 mg/kg, i.p., dose única). O limiar mecânico e a latência ao calor foram avaliadas na pata traseira direita dos animais, estes valores foram medidos utilizando filamentos de von Frey com intensidade crescente (6-100g) ou o teste de Hargreaves (através de um feixe de luz radiante de 60 W), respectivamente. Para avaliar a participação do receptor TRPV1 neste modelo foi utilizado o antagonista seletivo (SB-366791; 0,5 mg/kg; i.p.) ou provocada a dessensibilização das fibras TRPV1 positivas com o uso de um agonista TRPV1 potente (resiniferatoxina, 200 µg/kg, s.c.; administrado 7 dias antes da injeção de PAC). A hiperalgesia química causada pela capsaicina foi observada pela administração intraplantar de capsaicina (0,01 nmol/pata/100 µL). Também foram realizados ensaios para avaliar o aumento da expressão do receptor TRPV1 após a administração de PAC como o western blot (amostras do gânglio da raiz dorsal - GRD ou nervo ciático) e a imunofluorescência (GRD). A sensibilização do receptor TRPV1 foi avaliada utilizando a técnica de influxo de cálcio provocado pela capsaicina (500 nM) em GRD em cultura e expostos ao PAC (50 µM, 24 horas antes). A administração de PAC causou o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor 24 horas após a administração. O antagonista do canal TRPV1 ou a dessensibilização das fibras sensoriais TRPV1-positivas com o uso de

um agonista TRPV1 foram capazes de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia calor induzida por PAC. Também observamos o desenvolvimento de hiperalgesia química para o agonista TRPV1 capsaicina, aumento da imunorreatividade do receptor TRPV1 e do número de neurônios TRPV1 positivos de pequeno diâmetro em gânglios da raiz dorsal (GRD, L3-L5) 24 horas após a administração de PAC. Além disso, 24 horas de incubação com PAC em culturas de neurônios de GRD aumentou não só a percentagem de neurônios que responderam a capsaicina, mas também a amplitude de resposta causada pela capsaicina. Em conclusão, após a administração única de PAC o aumento da sensibilização e expressão do receptor TRPV1 poderia contribuir para o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor. Dessa forma, o bloqueio do receptor TRPV1 poderia ser explorado como um possível alvo para o tratamento da síndrome de dor aguda associada ao PAC.

Palavras-chave: Capsaicina; Resiniferatoxina; Alodinia; Hiperalgesia; Dor Neuropática.

ABSTRACT

The clinical use of paclitaxel (PAC) as a chemotherapeutic agent is limited by its adverse effects, especially pain induction. Although it is well known that prolonged treatment with paclitaxel could lead to neuropathic pain, single administration of PAC may also cause an acute pain syndrome, which is believed to be caused by a sensitization of nociceptors. The transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) is expressed mainly in nociceptors, where it plays a key role in the detection of several noxious painful stimuli. TRPV1 has been implicated with PAC-induced neuropathic pain, but its role in PAC-related acute pain syndrome is unknown. Thus, the goal of this study was to observe the participation of TRPV1 in a model of acute pain syndrome induced by PAC in rats. For this male Wistar rats (200-300g) were used. The acute pain model used was the intraperitoneal administration of PAC (1 mg/kg, i.p., dose única). The mechanical limiar and the heat latency were evaluated in the right hindpaw of animals, and these values were measured using von Frey hair filaments with increasing force (6-100g) or the Hargreaves test (a radiant heat stimulus with a high-intensity projector lamp bulb 60 W), respectively. To evaluate the involvement of the TRPV1 receptor in this model the selective antagonist (SB-366791; 0.5 mg/kg; i.p.) was used or the TRPV1-positive sensory fiber ablation using a potent TRPV1 agonist (reniferatoxin, 200 µg/kg; s.c.; administered 7 dias before the PAC injection). The chemical hyperalgesia to capsaicin was observed by the intraplantar injection of capsaicin (0.01 nmol/paw/100 µL). Different assays were used to evaluate the increase expression of TRPV1 such as western blot (dorsal root ganglion – DRG or sciatic nerve) and immunofluorescence (DRG). The TRPV1 sensitization was observed using the calcium influx induced by capsaicin (500 nM) in isolated DRG in culture exposed to PAC (50 µM, 24 hours before). Single administration of PAC produced mechanical allodynia and heat hyperalgesia 24 hours after administration. The TRPV1 antagonism or the TRPV1-positive sensory fiber ablation was able to largely reduce the mechanical and heat hyperalgesia induced by PAC. Twenty four hours after its injection PAC also induced chemical hyperalgesia to the TRPV1 agonist capsaicin (0.01 nmol/site), increased TRPV1 immunoreactivity and the number of TRPV1-positive neurons in dorsal root ganglion (DRG, L3-L5).

Moreover, 24 hours incubation with PAC (50 μ M) in cultured DRG neurons increased not only the proportion of neurons responsible to capsaicin, but also the amplitude of capsaicin-induced increase of calcium transients. In conclusion, TRPV1 increased expression and sensitization after PAC single injection could induce nociceptor sensitization and the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia. Then, the TRPV1 receptor could be explored as a possible target for the treatment of PAC-associated acute painful syndrome.

Keywords: Capsaicin; Resiniferatoxin; Allodynia; Hyperalgesia; Neuropathic Pain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Transmissão do estímulo nociceptivo. Diferentes vias envolvidas no transporte da informação nociceptiva da periferia até centros supra-espinhais.	36
Figura 2 - Imagem representativa da casca do Teixo do Pacífico (<i>Taxus brevifolia</i>) planta da qual foi extraído o paclitaxel (A). Estrutura química do paclitaxel (B).....	40
Figura 3 - Diagrama representativo do canal de TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide tipo1) e os seus mecanismos de ativação e modulação.	45
Figura 4 - A administração de PAC induziu alodinia mecânica e hiperalgisia ao calor em ratos (A).	57
Figura 5 - O antagonista do receptor TRPV1 foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgisia ao calor causada pelo paclitaxel (PAC).	58
Figura 6 - A dessensibilização de fibras TRPV1-positivas foi capaz de prevenir o desenvolvimento da alodinia mecânica e da hiperalgisia ao calor causada pelo paclitaxel (PAC).	59
Figura 7 - A administração de PAC induziu hipersensibilidade a capsaicina e aumentou a imunoreatividade do receptor TRPV1 no GRD e nervo ciático.	61
Figura 8 - A administração de paclitaxel (PAC) aumentou o número de neurônios TRPV1 positivos e a imunoreatividade para o receptor TRPV1 no GRD.	62
Figura 9 - Sensibilização do receptor TRPV1 e aumento do número de neurônios responsivos a capsaicina após a exposição ao paclitaxel (PAC) em neurônios do GRD.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma
µl – Microlitro
µM – Micrômetro
ANOVA – Análise de variância (do inglês... *Analysis of variance*)
BSA – Albumina sérica bovina (do inglês... *Bovine serum albumin*)
CEUA – Comissão de ética em uso de animais
CGRP – Peptídeo relacionado ao genes da calcitonina (do inglês *Calcitonin genes related peptide*)
DMSO – Dimetilsulfóxido
g – Gramas
GRD – Gânglio da raiz dorsal
GT – Gânglio trigêmio
HEPES - 4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazine ethanesulfonic acid
I.P. – Intraperitoneal
IASP – Associação internacional para o estudo da dor (do inglês *International Association of the Study of Pain*)
mg - Miligrama
mL – Mililitro
NIA – Agência Nacional de Investigação
nM – Nanômetro
nmol – Nanomol
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAC – Paclitaxel
Ph – Potencial hidrogeniônico
Phα1β – Peptídeo insolado da aranha *Phoneutria nigriventer* (do inglês *Peptide isolated from Phoneutria spider nigriventer*)
S.E.M – Erro padrão da media (do inglês *Average standard*)
SDS-PAGE – Poliacrilamida sulfato (do inglês *Polyacrylamide Sulfate*)
SNC – Sistema nervoso central
TRP – Receptor de potencial transitório (do inglês *Transient receptor potential*)
TRPA - Receptor de potencial transitório anquirina (do ingles *Transient receptor potential ankyrin*)
TRPC – Receptor de potencial transitório cananônico (do inglês *Transient receptor potential canonical*)
TRPM – Receptor de potencial transitório melastantina (do inglês *Transient receptor potential Melastatina*)

TRPML – Receptor de potencial transitório (do inglês *Transient receptor potential r mucolipin*)

TRPP - Receptor de potencial transitório (do inglês *Transient receptor potential polycystin*)

TRPV – Receptor de potencial transitório vanilóide (do inglês *Transient receptor potential vanilloid*)

TRPV1 – Receptor de potencial transitório vanilóide tipo1 (do inglês *Transient receptor potential vanilloid 1*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	34
1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOR.....	34
1.2 DOR RELACIONADA AO CÂNCER E AOS QUIMIOTERÁPICOS	38
1.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DOR NEUROPÁTICA E AGUDA CAUSADA POR PAC	42
1.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILOIDE 1 .	43
2 OBJETIVOS.....	48
2.1 OBJETIVO GERAL	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 ANIMAIS	49
3.2 REAGENTES	49
3.3 INDUÇÃO DA SÍNDROME DE DOR AGUDA MEDIADA POR PAC.....	49
3.4 TESTES NOCICEPTIVOS.....	49
3.4.1 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico (alodínia ao estímulo mecânico)	50
3.4.2 Determinação do limiar ao calor nocivo (hiperalgesia ao estímulo térmico).....	50
3.4.3 Avaliação de hipersensibilidade química induzida por PAC .	51
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
3.5.1 Avaliação da participação do TRPV1 na síndrome dolorosa aguda causada por PAC	51
3.5.2 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal	53
3.5.3 Influxo de cálcio	53
3.5.4 Imunofluorescência para o receptor TRPV1.....	54
3.5.5 Análise estatística	54
4 RESULTADOS	56
4.1 A ADMINISTRAÇÃO DE PAC INDUZIU NOCICEPÇÃO AGUDA EM RATOS	56
4.2 O tratamento com o antagonista do receptor TRPV1 ou a dessensibilização das fibras TRPV1-positivas reduziu a hipersensibilidade aguda mediada pelo PAC	57

4.3 A ADMINISTRAÇÃO DE PAC INDUZIU HIPERSENSIBILIDADE A CÁPSAICINA E CAUSOU AUMENTO DA IMUNORREATIVIDADE AO RECEPTOR TRPV1	60
4.4 O INFLUXO DE CÁLCIO MEDIADO PELO RECEPTOR TRPV1 É AUMENTADO APÓS A EXPOSIÇÃO AO PAC.....	63
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS.....	86
ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	87
ANEXO B: DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOR

Durante o processo de seleção natural, os animais desenvolveram vários mecanismos fisiológicos que permitiram a sua sobrevivência (Barroso et al., 2014), dentre eles um dos mais importantes está a dor, pois é através deste sintoma que os animais e humanos tem consciência de que sua integridade está sendo ameaçada (Cruvinel et al., 2010). Além deste aspecto protetor, a dor é um relevante problema de saúde, sendo uma razão bastante comum para a procura de atendimento clínico e uso de fármacos (Brennan et al., 2006). A dor gera um profundo impacto na qualidade de vida dos pacientes, levando a consequências tanto em nível fisiológico (aumento de complicações pós operatórias, desenvolvimento de dor crônica) psicológico (aparecimento de transtornos psiquiátricos como a depressão e ansiedade), social (menor capacidade de trabalho levando ao desemprego, menor renda familiar e interação social) e econômico (gastos com cuidados médicos e medicamentos) (Bassols et al., 2002; Fishman, 2007; Lohman et al., 2010).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial, ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão”, então esta sensação deve ser entendida como um fenômeno subjetivo (Loeser et al., 2008). Já o termo nocicepção, designa os processos de codificação neural e processamento de estímulos nocivos, e é este componente que podemos medir em modelos animais de dor (Loeser et al., 2008).

Dessa maneira, considera-se que existam três principais formas de dor: nociceptiva, inflamatória e neuropática (Gibbs et al., 2008). A dor nociceptiva tem como função proteger o organismo de uma possível lesão, para o seu bem-estar e sobrevivência (Woolf, 2010). Para que ocorra o processamento do estímulo nociceptivo é necessário que inicialmente, nociceptores (terminações nervosas livres de neurônios nociceptivos) sejam ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos. O corpo celular dos neurônios nociceptivos estão localizados em diferentes gânglios, como o gânglio da raiz dorsal (GRD) para o corpo, o gânglio nodoso para as vísceras e o gânglio do trigêmio (GT) para a face (Mantyh et al., 2006; Basbaum et al., 2009). De cada GRD sai um axônio que se divide em dois troncos, sendo que um deles se dirige para os tecidos periféricos e o outro para a medula espinhal no

caso dos nervos espinhais ou para o tronco encefálico no caso dos nervos cranianos (Devor, 1999).

Existem diferentes grupos de fibras baseadas em critérios anatômicos e funcionais que podem conduzir estímulos sensoriais, como as aferentes mielinizadas de grande diâmetro ($A\beta$) que medeiam a transmissão rápida de estímulos sensoriais inócuos (estímulos proprioceptivos e tato). Ao contrário, corpos celulares de pequeno e médio diâmetros dão origem a maioria dos nociceptores, incluindo fibras desmielinizadas e condutoras lentas de estímulos sensoriais, denominadas fibras C e as fibras $A\delta$ que são pouco mielinizadas de médio diâmetro e condutoras de estímulos rápidos dolorosos (Figura 1) (Rang et al., 1991; Julius et al, 2001).

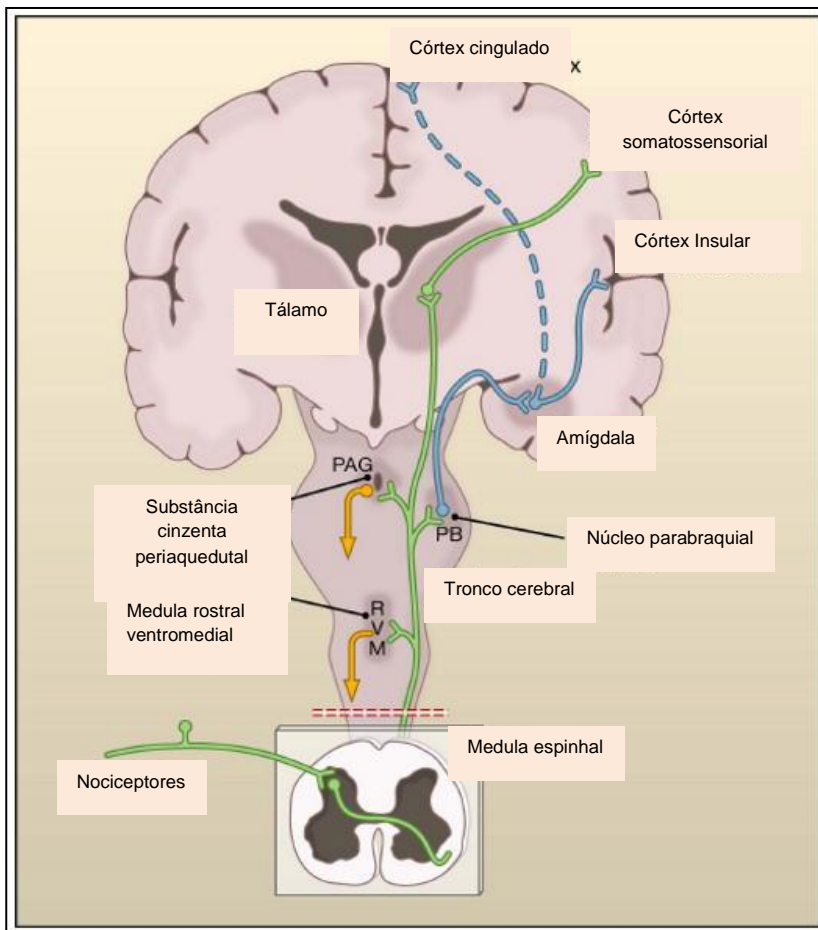


Figura 1 - Transmissão do estímulo nociceptivo. Diferentes vias envolvidas no transporte da informação nociceptiva da periferia até centros supra-espinhais. Adaptado de Basbaum et al. (2009).

Após a ativação dos nociceptores, a informação sensorial é transmitida até o corno dorsal da medula espinhal, principalmente lâminas I, II e V. As terminações pré-sinápticas nociceptivas possuem canais de cálcio regulados por voltagem do tipo N que permitem o influxo de cálcio e assim provocam a liberação de neurotransmissores excitatórios como a substância P (SP) e o glutamato. Após a liberação destes mediadores excitatórios ocorrerá a ativação de neurônios nociceptivos de segunda ordem e neurônios de ampla faixa dinâmica

que conduzem a informação até centros superiores. Esta informação pode ascender por duas vias nociceptivas até o córtex somatossensorial, insular e cingulado onde as diferentes dimensões da dor serão processadas (Hunt e Mantyh, 2001). A percepção do estímulo doloroso pode ascender pelos tratos nervosos espinotalâmico em direção ao tálamo, logo, essa informação é direcionada para o córtex somatossensorial (via espinotalâmica), o qual fornece informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Também, as projeções do núcleo parabraquial e amígdala convergem para o córtex insular e cingular (via espinoparabraquial amigdalóide), atribuindo o componente afetivo emocional à experiência dolorosa (Figura 1). O impulso elétrico que determina a sensação dolorosa pode também ser modulado por vias inibitórias (Basbaum et al., 2009; Moraes et al., 2014).

A dor de origem inflamatória resulta, resumidamente, da interação de mediadores inflamatórios liberados pelo tecido danificado com os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos. Porém, na dor inflamatória além da ativação dos nociceptores temos a produção de mediadores inflamatórios no tecido lesado e a ativação do sistema imune (Woolf, 2010). A dor inflamatória é também protetora e tem a função de resguardar o local lesado até a recuperação do tecido (Basbaum et al., 2009; Woolf, 2010). Já, quando esta forma de dor torna-se crônica, como nas artrites, pode persistir por meses e até anos, sendo importante o seu tratamento adequado (Ashburn e Staats, 1999).

A dor denominada de neuropática ocorre quando o sistema nervoso central ou periférico não estão funcionando corretamente, devido à lesão ou doença nestes tecidos (Loeser e Treede, 2008). Dessa forma, normalmente são descritos sintomas como parestesias, e sensação de queimação ou choque principalmente nas extremidades (Dougherty et al., 2004). Também pode ocorrer o aparecimento de sintomas como alodínia, que é a percepção dolorosa de estímulos previamente descritos como inócuos, e de hiperalgesia, que é descrito como a exacerbação da dor a estímulos já descritos como dolorosos (Loeser e Treede, 2008). A dor neuropática é de difícil tratamento e frequentemente torna-se crônica, o que provoca a incapacitação do paciente (Woolf, 2010). Ainda esta forma de dor pode ser provocada por dano ao tecido neuronal periférico pela administração de quimioterápicos no tratamento de pacientes com câncer (Mantyh, 2006). Além disso, a dor neuropática provocada por quimioterápicos reduz a qualidade de vida dos pacientes e muitas vezes impossibilita o tratamento correto dos tumores, por tornar-se um sintoma limitante para o aumento da dosagem (Quasthoff e Hartung, 2002). Então, a descoberta

dos mecanismos associados a dor provocada por quimioterápicos é relevante e poderia propor novas terapias analgésicas (Gilron et al., 2015).

1.2 DOR RELACIONADA AO CÂNCER E AOS QUIMIOTERÁPICOS

Dentre as doenças que apresentam percepção alterada de estímulos sensoriais, o câncer é merecedor de extensiva atenção, já que tem sido estimado que mais de 10 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com câncer a cada ano e até 2030 esses valores tendem a aumentar para 27 milhões segundo a organização mundial da saúde (OMS, 2014). O maior temor entre os pacientes com câncer e seus familiares é a falta de tratamento adequado para a dor que pode estar associada ao tumor ou aos tratamentos (Mantyh, 2006). É importante observar que o objetivo da terapia da dor oncológica é o de proporcionar suficiente alívio para que pacientes possam tolerar as abordagens terapêuticas necessárias para tratar o câncer, e mais do que isso é aumentar a qualidade de vida dos mesmos (Tay e Ho, 2009). De fato, o alívio de sintomas aflitivos pode ter um impacto positivo no curso da doença, já que estudos mostraram que a dor foi capaz de aumentar o crescimento dos tumores e metástases (Page et al., 1993; Sasamura et al., 2002).

Portanto, percebe-se que a dor relacionada ao câncer, independente de sua origem (induzida pelo tumor ou pelo tratamento antineoplásico), deveria se tornar parte integrante do tratamento do câncer, visando uma redução do sofrimento e mais do que isso, uma diminuição no número de mortalidade (Novotny e Szekeres, 2005). Para isto, é importante compreender os mecanismos neurobiológicos pelos quais os tumores geram e mantêm a dor (Pacharinsak e Beitz, 2008). A dor relacionada ao tumor é pelo menos parcialmente mantida por um estado de sensibilização sensorial através do crescimento das células tumorais no local e também pelas alterações neuroquímicas na medula espinhal que promovem um aumento da transmissão da informação nociceptiva (Mantyh, 2006), tornando a dor mais intensa e incontrolável.

A dor associada ao câncer pode também estar vinculada à terapias utilizadas no tratamento do tumor. De fato, a maioria de pacientes com câncer utiliza a terapia quimioterápica na tentativa de combater o tumor e isso se torna um dos fatores mais importantes na determinação da sobrevivência e qualidade de vida dos mesmos (Quasthoff e Hartung,

2002). Hoje em dia, tanto o aprimoramento de novos agentes quimioterápicos quanto o emprego de diferentes regimes de administração que os torne mais eficazes e seguros tem avançado, promovendo uma sobrevida prolongada dos pacientes e a promessa de um retorno à vida normal. Este progresso, entretanto, tem um preço, o sistema nervoso é frequentemente alvo da terapia na indução de toxicidade (Mantyh, 2006). A neurotoxicidade causada por quimioterápicos é uma complicação clinicamente significativa. Essa complicação faz com que os pacientes se tornem incapazes de completar esquemas de tratamento bem-sucedidos, em função da dor incapacitante provocada pela neuropatia sensorial (Scripture et al., 2006; Windebank e Grisold, 2008).

Dentre, os quimioterápicos que induzem dor após a administração está o paclitaxel (PAC) (Nicolaou et al., 1995; Plast, 2003; Sandra et al., 2006). O PAC inicialmente era obtido da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) (Figura 2), no qual sua extração varia entre 40 a 165 mg/Kg. Para se adquirir 1 Kg de PAC, era necessário derrubar, no mínimo 3 mil árvores. Esta substância foi descoberta em 1967 pelos cientistas Dr. Monroe E. Wall e o Dr. Mansukh C. Wani que isolaram componente da casca do Teixo e observaram sua atividade antitumor em uma variedade de tumores em roedores (Nicolaou et al., 1995; Plast, 2003; Sandra et al., 2006). Além disso, para tratar um único paciente seria necessário o corte e processamento de seis árvores com cem (100) anos. Por este motivo, surgiu a necessidade da elaboração química laboratorial através de síntese e semi-síntese da PAC. Foi assim que, após a síntese formal da estrutura do PAC (Figura 2B) esta molécula foi descrita formalmente pelo químico Nicolaou (Peltier e Russel, 2006; Nicolaou, 2009).

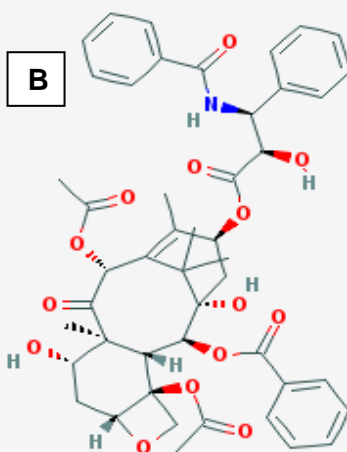


Figura 2 - Imagem representativa da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*) planta da qual foi extraído o paclitaxel (A). Estrutura química do paclitaxel (B).
Fonte: Mike Trumball; Hauser Northwest.

Desde então o PAC tornou-se um dos quimioterápicos mais efetivos na clínica médica para o tratamento de pacientes que apresentam diferentes tumores sólidos, como câncer de ovário e mama, sarcoma de Kaposi, câncer de pulmão, câncer de cérebro e câncer de garganta. Este quimioterápico apresenta sua ação por interferir na

função normal de crescimento do microtúbulo, impossibilitando o crescimento rápido e desordenado das células tumorais. O PAC se liga especificamente no microtúbulo, propriamente na proteína tubulina, sendo que o complexo resultante microtúbulo/paclitaxel não pode ser desfeito, tornando-se estável. Isto afeta a célula de maneira adversa porque a chamada instabilidade dinâmica é necessária para o funcionamento de transporte celular (Peltier e Russel, 2006; Nicolaou, 2009).

A maioria dos agentes antineoplásicos apresenta potencial neurotóxico, e para o PAC esta neurotoxicidade é uma complicação clinicamente significativa, isto porque apresenta efeitos colaterais limitantes da dose (Polomano et al., 2001; Scripture et al., 2006; Windebank e Grisold, 2008). A principal manifestação de toxicidade é a síndrome dolorosa crônica, caracterizada como uma dor neuropática, observada ao longo do tratamento com PAC (Rowinski et al., 1993; Kohler e Goldspiel, 1994; Polomano et al., 2001; Siau et al., 2006; Loprinzi et al., 2011). Além disso, muitas vezes surge a necessidade de reduzir a dose do fármaco, prejudicando a terapia e podendo afetar gravemente a qualidade de vida dos pacientes com câncer (Polomano et al., 2001).

Apesar de a dor crônica estar bem estabelecida, tem sido relatado recentemente que uma grande proporção de pacientes se queixa de sensibilização a dor nos primeiros dias de tratamento com o paclitaxel, caracterizando a dor aguda da síndrome dolorosa induzida por esse agente quimioterápico (Loprinzi et al., 2007). Além disso, a dor crônica experimentada por alguns pacientes parece ser de alguma forma relacionada com a intensidade da dor aguda (Loprinzi et al., 2011). Também, a maioria dos fármacos indicados para o tratamento da dor aguda induzida pelo PAC, como opioides e anti-inflamatórios não esteroidais causam diversos efeitos adversos e não apresentam eficácia terapêutica para esta síndrome dolorosa (Loprinzi et al., 2011; Fornasari et al., 2012; Nalamachu et al., 2013). Porém, os mecanismos envolvidos na dor aguda causada pelo paclitaxel são mal compreendidos e protocolos padronizados para o tratamento deste tipo de dor ainda não foram relatados (Pachman et al., 2011). A dor aguda observada após o tratamento com paclitaxel é normalmente entendida como uma sensação de queimação e choque em pacientes (Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012) e algumas evidências têm apontado uma provável sensibilização dos nociceptores nesta síndrome dolorosa (Loprinzi et al., 2011; Pachman et al., 2011).

Existe uma ampla variedade de moléculas envolvidas na transdução de estímulos dolorosos relacionadas com esta patologia dolorosa, podendo ser investigadas como elementos de grande importância para a descoberta de novos analgésicos. Dentre estas, um relevante alvo é o receptor de potencial transitório do tipo 1 (TRPV1), que pode ser encontrado em nociceptores e é responsável por mediar a sensação de queimação em diversas patologias de dor (Caterina et al., 1997; Schumacher, 2010). Desta maneira, este receptor poderia estar envolvido no desenvolvimento da síndrome aguda causada pelo paclitaxel.

1.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DOR NEUROPÁTICA E AGUDA CAUSADA POR PAC

A dor neuropática é uma reação adversa comum de várias classes de fármacos quimioterápicos, incluindo o PAC (Jaggi e Singh, 2012). Esta forma de dor pode ser provocada por efeitos diretos e indiretos sobre os nervos sensoriais, causando alteração na amplitude e na velocidade de condução do potencial de ação provocando dor. Dessa forma, o uso de modelos animais de dor neuropática causada por quimioterápicos é de grande importância para o desenvolvimento de novos analgésicos (Jaggi e Singh, 2012). Vários estudos relatam que a administração de PAC, em roedores causa neuropatia com dano neuronal periférico com degeneração axonal, provocando dor neuropática (Cliffer et al., 1998). Além disso, foi observado que a dor neuropática evocada por PAC, está associada a um aumento do número de mitocôndrias danificadas em axônios sensoriais primários (Flatters e Bennett, 2006). E também, Siau e Bennett (2006) demonstraram a atenuação da dor neuropática induzida por PAC, com fármacos que diminuem os níveis de cálcio extracelular e intracelular em membranas permeáveis a quelantes de cálcio. Dessa forma, na dor neuropática causada por PAC, é evidente o dano neuronal e mitocondrial, além de um possível aumento das concentrações de cálcio intracelulares, todos estes fenômenos poderiam auxiliar no desenvolvimento de excitação periférica dos neurônios sensoriais (Jaggi e Singh, 2012).

No entanto, outros mecanismos parecem ser importantes para o desenvolvimento de dor neuropática causada por PAC, como os canais de cálcio modulados por voltagem, já que a toxina $Pha1\beta$ reduziu estes comportamentos em ratos (Rigo et al., 2013). Também, foi observado que a subunidade $\alpha1\delta1$ dos canais de cálcio regulados por voltagem poderia ter sua expressão aumentada na medula espinhal dorsal após

administração de PAC (Xiao et al., 2007; Gauchan et al., 2009a; Gauchan et al., 2009b; Gauchan et al., 2009c) e a administração de gabapentina diminuiu a nocicepção causada pelo paclitaxel (Matsumoto et al., 2006). Os canais de sódio regulados por voltagem também parecem ser importantes para o desenvolvimento de dor neuropática devido a administração de quimioterápicos (Ling et al., 2007). Também, foi descrito que bloqueadores de canais de sódio regulados por voltagem (doses baixas de tetrodotoxina) poderiam reduzir a dor neuropática por paclitaxel (Nieto et al., 2008). Então estes estudos demonstram que canais de cálcio e de sódio regulados por voltagem teriam uma participação na dor neuropática causada por PAC (Jaggi e Singh, 2012).

Outro mecanismo importante para a dor neuropática causada pelo PAC seria a inflamação dos neurônios periféricos, já que foram observados níveis aumentados do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da interleucina-1 β (IL-1 β) no GRD lombar após administração de PAC (Lodeboer et al., 2007). O papel do neuropeptídeo substância P é também definido na neuropatia induzida por PAC, demonstrando um aumento da liberação de substância P a partir de cultura de neurônios do GRD de ratos adultos tratados com PAC (Jaggi e Singh, 2012). Dessa forma, receptores periféricos que poderiam causar a liberação de substância P de neurônios sensoriais podem também ter participação neste processo, como o TRPV1. Recentemente, um estudo mostrou que receptor TRPV1 poderia estar envolvido na dor crônica causada por paclitaxel em ratos (Hara et al., 2013; Li et al., 2015). No entanto, o envolvimento deste canal na dor aguda ainda não foi esclarecido.

Poucos mecanismos foram até o momento descritos para contribuir com a dor aguda causada por PAC. Um estudo recente relata que a nocicepção crônica causada por PAC poderia estar associada a incidência da nocicepção aguda causada por PAC em ratos (Rigo et al., 2013). Além disso, o PAC poderia provocar dor aguda pela ativação do receptor toll like 4 (TLR4) na medula e GRD (Yan et al., 2015). No entanto nenhuma terapia padrão foi estabelecida para tratar a síndrome de dor aguda ou crônica relacionada ao paclitaxel. Dessa forma, ainda é interessante o estudo dos mecanismos envolvidos neste processo doloroso.

1.4 RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILOIDE 1

Os receptores de potencial transitório (Canais TRP) são um grupo de canais iônicos, localizados principalmente na membrana plasmática de numerosos tipos de células com importância primordial para a

sobrevivência e função adequada das células humanas e animais (Minke, 2010). Estes canais fazem parte de uma das maiores famílias de canais iônicos, e são conhecidos por possuir uma ampla variedade de funções biológicas e mecanismos de ativação (Vriens et al., 2009; Minke, 2010). Até o momento foram já descritos mais de 28 membros de canais TRP em mamíferos e estes são subdivididos em 6 famílias: TRPC (canônico); TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPM (melastatina), TRPP (policistina) e TRPML (mucolipina) (Vriens et al., 2009; Minke, 2010).

Muitos canais TRP são ativados por estímulos nociceptivos, como o TRPV1 e o TRPA1 (receptor de potencial transitório anquirina 1), e dessa forma se tornaram alvos interessantes para a descoberta de novos analgésicos (Vriens et al., 2009; Minke, 2010). Uma característica que auxiliou a descoberta do receptor TRPV1 (Caterina et al., 1997; Julius, 2013) foi a sua capacidade de ser ativado por compostos pungentes e irritantes presentes em plantas, estas preparações são utilizadas a muitos anos na culinária e no tratamento da dor e inflamação. Dessa forma, foram encontrados em plantas, diferentes agonistas do receptor TRPV1, como a capsaicina (encontrada na espécie *Capsicum sp.*) e a resiniferatoxina (encontrada na *Euphorbia resinifera*) (Calixto et al., 2005; Schumacher, 2010; Julius, 2013).

A capsaicina é uma substância neurotóxica extraída da pimenta vermelha, que é responsável pelo sabor ardido desta especiaria. Quando aplicada na pele ou administrada em animais a capsaicina produz irritação caracterizada por eritema, dor em queimação e aumento da temperatura da pele, causando posteriormente um efeito analgésico a outros estímulos (Jancsó et al, 1981). Então, a reação dolorosa e a subsequente dessensibilização, é causada pela degeneração de fibras nociceptivas induzida pela capsaicina. Estes efeitos foram atribuídos à estimulação direta de neurônios nociceptivos específicos (fibras de pequeno diâmetro) que modulam a sensação por calor nocivo e irritantes químicos (Jancsó et al., 1997; Holzer, 1991).

Visto que a capsaicina apresentava afinidade a determinadas classes de fibras sensoriais, esta deveria ativar um receptor específico que modula este tipo de sensação dolorosa (Szolcsányi e Jancsó-Gábor, 1975). Esse receptor hoje é chamado de TRPV1 e é um canal iônico inespecífico, envolvido na interação das células com os diferentes estímulos extracelulares. O TRPV1 é composto por uma proteína integral com seis alças transmembranares e um poro hidrofóbico, entre a quinta e sexta região, com as caudas carboxil e amino terminais localizadas intracelularmente, sendo que a última contém seis repetições de anquirina (Figura 3). Este é um canal catiônico não-seletivo, por

permitir a passagem de íons, mas com maior afinidade pelo cálcio (Ca^{+2}) (Szallasi et al., 2007).

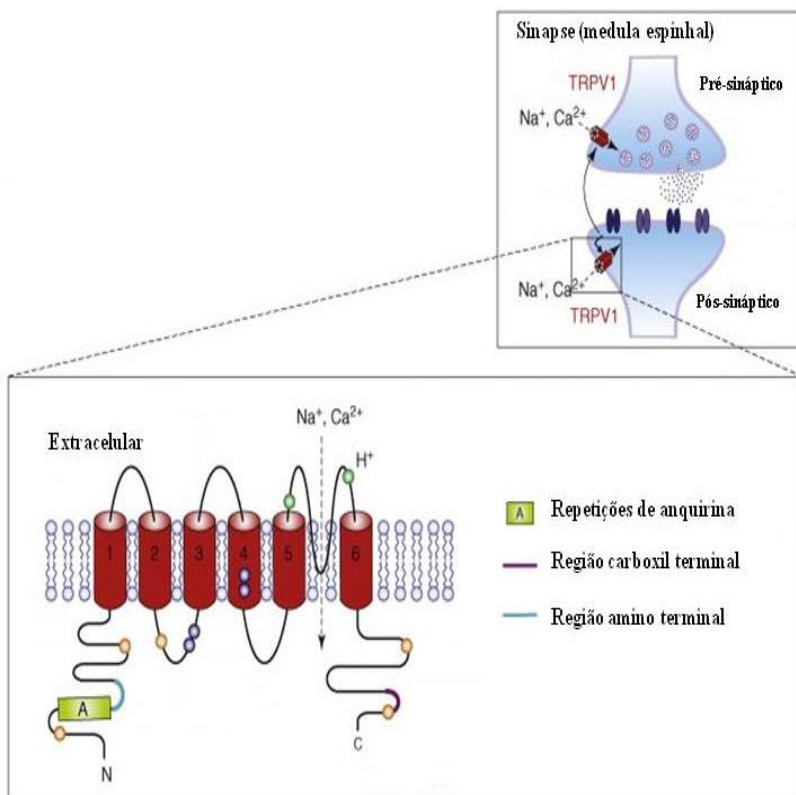


Figura 3 - TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide tipo1) Diagrama representativo do canal TRPV1 e os seus mecanismos de ativação e modulação. Adaptado de Kauer et al., (2009).

Este canal é expresso preferencialmente em neurônios sensoriais, nos GRD, GT, gânglios nodoso e vagal e também no SNC (sistema nervoso central), além disso pode ser encontrado em tecidos não neuronais como, músculo liso, mastócitos, queratinócitos, pulmão, rim e fígado (Schumacher, 2010; Julius, 2013). O TRPV1 é expresso unicamente em fibras nociceptivas C e $\text{A}\delta$ o que valoriza sua

importância no que se refere à dor, porque estas fibras são importantes para a condução desta forma de estímulo. Quando o receptor TRPV1 é ativado ocorre principalmente o influxo de cátions (especificamente de cálcio) (Calixto et al., 2005). Este processo estimula a liberação de vários peptídeos na periferia, como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Szallasi et al., 2007; Basbaum, 2009), que causam inflamação neurogênica no local (Szolcsányi 2014). Além disso, o influxo de cálcio auxilia na geração de potenciais de ação até a medula espinhal onde o estímulo é conduzido a estruturas supra-espinhais (Schumacher, 2010; Julius, 2013).

O receptor TRPV1 é também descrito como um canal ativado por calor nocivo ($> 43^{\circ}\text{C}$), dessa forma a sua ativação está relacionada com a sensação de queimação elucidada pela aplicação de capsaicina. Além disso, este canal pode, em situações de dano tecidual, ser ativado por pH abaixo do fisiológico e ser também sensibilizado por substâncias inflamatórias de forma indireta (como a bradicinina e trifosfato de adenosina) (Caterina et al., 1997; Schumacher, 2010; Julius, 2013).

Observando que este canal é ativado por diferentes estímulos nocivos, ele foi considerado como um integrador molecular desta forma de sensação e iniciou-se a busca de analgésicos que agissem como antagonistas do TRPV1. Além disso, o bloqueio do receptor TRPV1 foi capaz de reduzir a nocicepção em diferentes modelos de dor inflamatória, dor neuropática, de dor do câncer, e este tem sido grandemente implicado como mediador da hiperalgesia à estímulos térmicos (Schumacher, 2010; Julius, 2013).

Diferentes antagonistas do receptor TRPV1 foram desenvolvidos de forma sintética e apresentam alta especificidade a este receptor, porém o fato que reduziu o interesse destes compostos para o desenvolvimento de fármacos seguros foi quando composto AMG-517 foi testado em humanos e induziu severa hipertermia (Gavva et al., 2008). Dessa forma, tem se dado ênfase a descoberta de novos antagonistas que não alterem a temperatura corporal e que possam entrar na clínica de forma segura (Schumacher, 2010; Julius, 2013).

Também foram desenvolvidos produtos para aplicação cutânea de capsaicina, que podem ser aplicados em tecidos cutâneos dos pacientes que possuem alodínia, hiperalgesia ou dor espontânea. A administração de capsaicina sobre estes locais provoca inicialmente uma resposta inicial que consiste em eritema, dor e aumento de temperatura, muitas vezes descritas como queimação, seguida por um extenso período de insensibilidade marcado por uma dessensibilização das fibras nervosas aferentes, como já descrito em animais (Calixto et al., 2005;

Schumacher, 2010; Julius, 2013). O efeito analgésico da capsaicina pode se prolongar por meses e é provocado pela dessensibilização dos neurônios de pequeno a médio diâmetro que expressam o canal TRPV1, porque a ativação de grande porte deste receptor causa um aumento exacerbado da quantidade de influxo de íons de cálcio para dentro destas células o que provoca também depleção dos neuropeptídeos (CGRP e substância P) (Calixto et al., 2005; Schumacher, 2010; Brederson et al., 2013; Julius, 2013). Dessa forma, agonistas dos receptores TRPV1, como capsaicina e resiniferatoxina, são utilizados como substâncias farmacológicas para o estudo da contribuição das vias sensíveis à capsaicina e o desenvolvimento de respostas nociceptivas (Calixto et al., 2005; Schumacher, 2010; Brederson et al., 2013; Julius, 2013; Trevisan et al., 2013).

Dessa maneira, é importante estudarmos a participação deste canal em diferentes patologias dolorosas, como a dor induzida por quimioterápicos. A participação do receptor TRPV1 já foi descrita em modelos de neuropatia causados por paclitaxel e oxaliplatina (Hara et al., 2013). Porém ainda não foi estudado a participação deste canal na dor aguda causada por paclitaxel. E embora a dor neuropática crônica induzida por doses repetidas de paclitaxel esteja muito bem estabelecida, muito pouco se sabe sobre os mecanismos que causam a fase aguda da dor induzida por paclitaxel (Yan et al., 2015). Dessa forma, visto que os pacientes apresentam dor do tipo queimação após uma dose única deste quimioterápico e como já foi relatada a possível sensibilização de nociceptores após administração de paclitaxel (Alessandri-Haber et al., 2004); este trabalho tem como objetivo avaliar o envolvimento do TRPV1 em um modelo de síndrome de dor aguda induzida pelo paclitaxel em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do receptor TRPV1 em um modelo de síndrome de dor aguda induzida pelo PAC em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o decurso temporal da nocicepção mecânica e térmica ao calor no modelo de síndrome de dor aguda induzida por PAC em ratos;
- Observar o efeito analgésico do antagonista seletivo do TRPV1 no modelo de síndrome de dor aguda induzida por PAC em ratos;
- Investigar a participação das fibras TRPV1 positivas no modelo de síndrome de dor aguda induzida por PAC em ratos;
- Avaliar se a administração aguda de paclitaxel poderia aumentar a expressão do receptor TRPV1 no GRD e nervo ciático e causar hiperalgesia química a capsaicina;
- Observar se o PAC poderia provocar sensibilização do receptor TRPV1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (200-300 g) criados no biotério da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e Universidade do Extremo Sul Catarinense (Unesc). Os protocolos experimentais foram autorizados pela Comissão de Ética no uso de animais da UFSM (CEUA, número do processo: 107/2010). Os animais foram mantidos em um ambiente controlado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com um ciclo de 12 horas de luz e escuro e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatizados no laboratório durante pelo menos 1 hora. Todos os experimentos foram realizados entre 08:00 às 17:00 horas. Os protocolos experimentais estão em conformidade com as diretrizes de éticas atuais para a investigação de dor experimental em animais da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (Zimmermann, 1983). Além disso, o número de animais e a intensidade de estímulo nocivo utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes dos tratamentos. A avaliação comportamental foi realizada de forma cega no que diz respeito à administração de drogas.

3.2 REAGENTES

Os reagentes especificados foram comprados da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA). O PAC (6 mg/mL, dissolvido em Cremophor EL e etanol desidratado) foi adquirido a partir de Glenmark (Buenos Aires, Argentina), e foi dissolvido em solução salina hipotônica (0,9% NaCl) (Rigo et al., 2013).

3.3 INDUÇÃO DA SÍNDROME DE DOR AGUDA MEDIADA POR PAC

A dor aguda mediada por PAC foi induzida por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) nos animais e após diferentes tempos foram realizados testes nociceptivos ou outras análises. O veículo utilizado foi salina 0,9% (NaCl, 10 ml/kg) (Rigo et al., 2013).

3.4 TESTES NOCICEPTIVOS

3.4.1 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico (alodínia ao estímulo mecânico)

O limiar de retirada da pata 50% (limiar 50%) dos animais foi avaliado utilizando o paradigma ‘up-and-down’, tal como descrito anteriormente (Chaplan et al., 1994). Em primeiro lugar, os ratos foram aclimatizados (1 hora) em caixas de plexiglas individuais (9 x 7 x 11 cm) sobre uma plataforma elevada de malha de arame para permitir o acesso à superfície plantar das patas traseiras. Após, filamentos de von Frey de intensidade crescente (6-100g) foram aplicados na superfície plantar da pata traseira direita dos animais com uma pressão suficiente para dobrar o filamento. A ausência da retirada da pata depois de 5 segundos levou ao uso do próximo filamento com o aumento de peso, ao passo que quando houve resposta positiva de retirada da pata, levou-se à utilização do próximo filamento mais fraco. Este paradigma foi continuado até um total de seis medições. O limiar 50% então foi calculado a partir das pontuações resultantes (Dixon, 1980). A alodínia mecânica foi considerada como uma diminuição do limiar mecânico, quando comparado com valores basais (antes da administração dos tratamentos). O limiar 50% expresso em gramas (g) foi avaliado antes da administração do PAC (valores basais), e após diferentes tempos da administração do PAC (6, 12, 24, 48, e 72 horas), ou nos diferentes protocolos descritos abaixo.

3.4.2 Determinação do limiar ao calor nocivo (hiperalgesia ao estímulo térmico)

Para verificar a resposta dos animais à um estímulo térmico ao calor nocivo a latência de retirada da pata traseira direita foram determinada como descrito anteriormente (Klafke et al., 2012). Para isso, um feixe de luz radiante de 60 W foi dirigido para a pata traseira direita (total de 99% de intensidade). O tempo entre o início do estímulo e da retirada da pata foi medido e usado como um índice de latência térmica nociceptiva. A latência máxima de 25 segundos foi imposta para evitar danos aos tecidos. A latência basal (15-17 segundos) foi determinada antes da injeção do PAC (valores basais), e após diferentes tempos da administração do PAC (6, 12, 24, 48, e 72 horas), ou nos diferentes protocolos descritos abaixo.

3.4.3 Avaliação de hipersensibilidade química induzida por PAC

Para determinar a possível hipersensibilidade mediada pelo receptor TRPV1, foi utilizado o teste da capsaicina num paradigma de dose sub-limiar (Sakurada et al., 1992). Após 24 horas da administração de PAC ou veículo, o comportamento nociceptivo foi observado após a injeção subcutânea de capsaicina (0,01 nmol/pata, 100 µl) sob a superfície dorsal da pata traseira direita (intraplantar, i.pl.). Os animais foram observados individualmente durante 5 minutos após a injeção de capsaicina. O tempo gasto lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado e foi utilizado como uma medida da nocicepção. A dose sub-limiar de capsaicina foi escolhida com base em experiências anteriores realizadas no nosso laboratório, para escolher uma dose que não induzisse resposta nociceptiva.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 Avaliação da participação do TRPV1 na síndrome dolorosa aguda causada por PAC

Inicialmente para observar o papel do canal TRPV1 na síndrome de dor aguda induzida por PAC foi administrado o antagonista seletivo do receptor TRPV1 (SB-366791; 0,5 mg/kg, i.p) (Varga et al., 2005) ou veículo (1% dimetilsulfóxido - DMSO em NaCl 0,9%, i.p.) em ratos previamente injetados com PAC ou veículo (após 24 horas da administração de PAC ou veículo foi realizada a administração do antagonista TRPV1 ou veículo do antagonista), e após foram avaliados os limiares de pata mecânicos ou a latência aos estímulos térmicos no tempo de 0,5, 1, 2, e 4 horas após o tratamento com SB-366791 ou veículo.

Também, a temperatura retal dos animais foi mensurada após 1 hora do tratamento com o antagonista TRPV1 ou veículo para excluir a possibilidade de desenvolvimento de hipertermia um efeito adverso comum de compostos antagonistas deste receptor. A medida da temperatura após 1 hora do tratamento foi comparada com os valores basais antes da administração. A detecção da temperatura corporal foi realizada utilizando um termômetro digital.

Em outro experimento foi utilizado um protocolo de dessensibilização para as fibras TRPV1 positivas usando a injeção subcutânea (s.c.) de RTX (um potente agonista TRPV1) (Steiner et al., 2007). Para isso, os ratos foram pré-tratados com uma única injeção de

RTX (200 µg/kg, s.c.) ou veículo (10% de etanol, 10% de Tween 80 em NaCl 0,9%, 1 ml/kg) sob anestesia (mistura de cetamina e xilazina, 90 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente, i.p.). Em seguida, após 7 dias, os animais foram injetados com veículo ou PAC e os limiares nociceptivos foram observados após 24 horas.

Para confirmar a redução da quantidade de fibras TRPV-positivas após o tratamento RTX foi mensurada a imunorreatividade ao receptor TRPV1 no GRD após 7 dias do tratamento com RTX ou veículo. Também foi avaliada a imunorreatividade para o receptor TRPV1 após a administração de PAC ou veículo (após 24 horas) no nervo ciático e GRD, para detectar o possível aumento da expressão deste receptor.

A análise por Western blot foi efetuada como descrito anteriormente (Trevisan et al., 2013). Em primeiro lugar, amostras do GRD e do nervo ciático foram removidas e os tecidos foram homogeneizados num tampão de lise contendo 10 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 0,1 mM de NaF, 10 µg/mL de aprotinina, 10 mM β-glicerofosfato, 1 mM de fluoreto de fenilmetanossulfonilo, 1 mM de DL-ditiotreitol e 2 mM de ortovanadato de sódio em HEPES 10 mM, pH 7,9. Após a centrifugação (3000 xg durante 30 minutos a 4°C), o sobrenadante contendo a fração de membrana contendo o TRPV1 foi recolhido. O teor de proteína foi determinado utilizando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976). As amostras (20 µg) foram misturadas em tampão Tris 200 mM (contendo glicerol a 10%, SDS a 2%, 2,75 mM de β-mercaptoetanol e 0,04% de azul de bromofenol) e após foram fervidas durante 10 minutos. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel a 10% de dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE) e após foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno. A coloração de Ponceau serviu como um controle da carga de proteínas (Romero-Calvo et al., 2010). As membranas foram digitalizadas, quantificadas com a versão PC de Scion Imagem e posteriormente processadas usando um sistema SNAP i.d. (Millipore, Billerica, MA, EUA). Primeiro, a membrana foi bloqueada com albumina sérica bovina a 1% em 0,05% de Tween 20 em solução salina Tris-borato, e em seguida, incubadas durante 10 minutos com o anticorpo primário específico para o TRPV1 (anticorpo policlonal anti-TRPV1; Santa Cruz Biotecnologia, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) diluído a 1:1000 em TBS-T (tampão trisma-salina com tween 20 a 0,05%). As membranas foram lavadas três vezes, com TBS-T, seguido por incubação com anticorpo secundário acoplado a fosfatase alcalina (1:3000, anti-IgG de coelho; Santa Cruz Biotecnologia, Inc., Santa Cruz, CA, EUA) durante 10 minutos. As bandas de proteína foram

visualizadas com 4-nitro-azul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP; Millipore, Billerica, MA, EUA). As membranas foram secas, digitalizadas e quantificadas com o Scion Image versão PC de imagem do National Institute of Health (NIH). Os resultados foram normalizados para os valores de densitometria utilizando o grupo controle como padrão e expressa como quantidade relativa de TRPV1.

3.5.2 Cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Os GRD foram removidos a partir de ratos sem tratamento prévio, após os neurônios foram dissociados em neurônios individuais por tratamento enzimático com 0,1% (w/v) de papaína e 0,25% (w/v) de collagenase tipo 1A por 30 minutos, com agitação ocasional e trituração através de pipetas de Pasteur. As células foram então colocadas em frascos revestidos com poli-L-lisina e laminina, e o meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina foi utilizado para o cultivo celular. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com PAC (50 μ M) ou veículo. As culturas foram mantidas a 37°C numa atmosfera saturada de água com 5% de CO₂ (Gomes et al., 2004) e foram utilizadas para os experimentos de influxo de cálcio após 24 horas da incubação com PAC ou veículo.

3.5.3 Influxo de cálcio

Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (20-25 °C) (Castro-Junior et al., 2013). Primeiramente, os neurônios foram carregados com a sonda para cálcio Fluo 4-AM (Molecular Probes, 3 μ M) durante 30 minutos em solução salina tamponada com HEPES contendo (em mM, HBSS): 124 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1,2 de MgCl₂, 10 de glicose, e 25 de HEPES (pH 7,4). Após os frascos foram lavados em HBSS, e transferidos para um sistema de câmara de perfusão (BIOPTECHS) e colocados sobre a plataforma de um microscópio. A solução de HBSS (sozinho ou com os tratamentos) foi continuamente perfundida (0,6 ml/min) através de uma bomba peristáltica (BIOPTECHS) para aquisição da imagem.

A imagem do influxo de cálcio foi realizada com um escaneamento a laser usando um SP5 sistema focal Leica, usando o software LAS com uma lente objetiva de 20x. O Fluo 4-AM (sonda para cálcio) foi fotografado pela excitação com uma linha de laser de argônio de 488 nm e a luz emitida foi recolhida em uma banda de emissão de

510-570 nm. As células foram estimuladas durante HBSS contendo capsaicina (500 nM) por 20 segundos. Para acessar as percentagem de células neuronais que responderam a capsaicina, um estímulo com KCl (30 mM) foi dado no final de cada registro. Apenas as células que responderam KCl foram contabilizados para a análise de capacidade de resposta a capsaicina. Alterações na fluorescência (F) foram normalizadas para a fluorescência inicial (F₀) para cada célula e foram expressas como (F/F₀) x 100 (% da linha de base). Os dados foram reunidos em 3 experimentos diferentes.

3.5.4 Imunofluorescência para o receptor TRPV1

Para realizar os experimentos de detecção da proteína TRPV1 no GRD de ratos, primeiramente os animais foram injetados com PAC (1 mg/kg, i.p.) ou veículo, e após 24 horas as amostras foram retiradas. Para isso, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental (50 mg/kg, i.p.) e perfundidos através da aorta ascendente com soro fisiológico, seguido por 4% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (4 °C). Após, a perfusão amostras do GRD entre L3, L4 e L5 foram dissecadas, pós-fixadas em 4% de paraformaldeído durante 2 horas, que foi então substituído durante a noite com 30% de sacarose. Após, todos os GRD foram embebidos em um marcador OCT, e secções de GRD (14 µM) foram cortadas em criostato e processadas para imunofluorescência. As secções foram bloqueadas com 2% de BSA em 0,3% de Triton X-100 durante 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas durante a noite a 4 °C com um TRPV1 policlonal (1:200, Santa Cruz, CA, EUA). Após lavagem com PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado (AlexaFluo-594, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) durante 1 hora à temperatura ambiente. Subsequentemente, as secções foram lavadas com PBS. Finalmente, elas foram tamponizadas com Fluoromount e selados com esmalte. As secções foram analisadas por um microscópio confocal a laser (TCS SP5, Leica Lasertechnik, Heidelberg, Alemanha). Em seguida, os diâmetros das células TRPV1-positivas foram medidos e analisados (Cunha et al., 2010). A intensidade da fluorescência e diâmetro de células foram determinadas usando o Image J (Java based).

3.5.5 Análise estatística

Todos os valores foram expressos como média ± SEM. As porcentagens de inibição foram apresentadas como a média ± SEM e

calculadas com base nas respostas máximas desenvolvidas, obtidas após a injeção de PAC, quando em comparação com animais tratados com veículo (controle). A significância estatística entre os grupos foi avaliada pelo teste de "t" de Student, ou análise variância (ANOVA) de uma ou duas vias, quando apropriado. O teste post hoc de Bonferroni foi realizado quando apropriado. Para atender os pressupostos da ANOVA, os dados de limiares mecânicos foram submetidos a transformação a valores de logaritmo antes da análise estatística. Valores de P inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos (GraphPad Software, versão 5.0, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA).

4 RESULTADOS

4.1 A ADMINISTRAÇÃO DE PAC INDUZIU NOCICEPÇÃO AGUDA EM RATOS

A administração de uma única dose de PAC por via intraperitoneal (Figura 4A) causou alodinia mecânica e hiperalgesia ao calor em ratos, observada 24 e 48 horas após o tratamento (o limiar ou latência de retirada de pata aos estímulos mecânico e térmico reduziram de 33 ± 5 g e 18 ± 1 segundos, para 11 ± 1 g e 11 ± 1 segundos após 24 horas da administração de PAC, respectivamente) (Figura 4B e 4C). No entanto em 6, 12 ou 72 horas após a administração única de PAC não foi observado o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica ou ao calor (Figura 4B e 4C). Dessa forma, o tempo de 24 horas após a injeção de PAC foi utilizado para observar o papel do canal TRPV1 no modelo de síndrome de dor aguda causada por PAC.

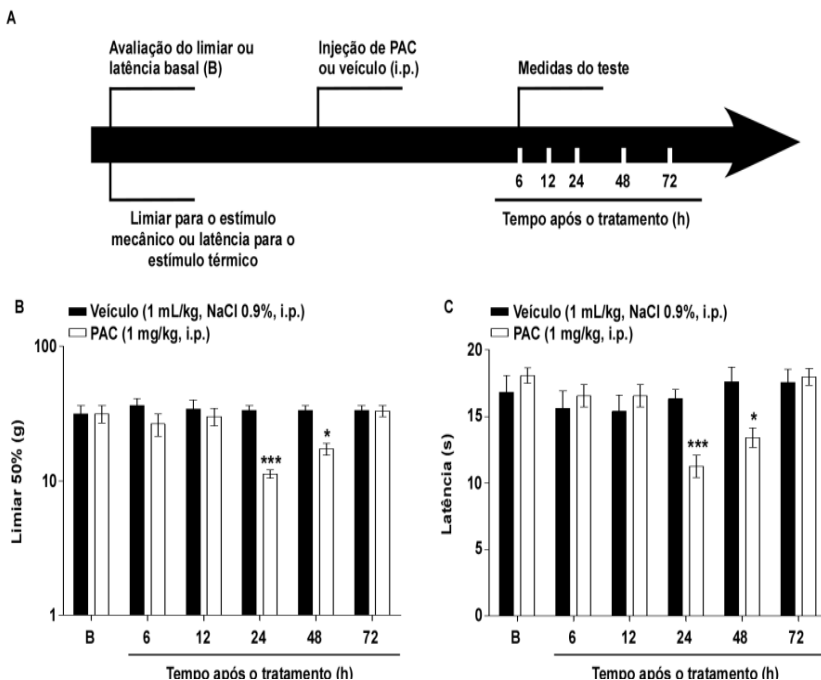


Figura 4 - A administração de PAC induziu alodinia mecânica e hiperalgesia ao calor em ratos (A).

Representação do protocolo experimental usado nos experimentos. O limiar mecânico (B) ou a latência ao estímulo térmico ao calor (C) foi avaliado em diferentes tempos (6, 12, 24, 48 ou 72 horas) após a administração de PAC (1 mg/kg, i.p) ou veículo (NaCl 0,9%, i.p). Os valores basais (descritos como B nos gráficos) foram determinados antes da administração de PAC ou veículo. Os dados foram representados como a média \pm S.E.M. para 5-6 animais. *P <0,05; ***P <0,001; quando comparado com animais tratados com veículo ou os valores basais, ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni.

4.2 O TRATAMENTO COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR TRPV1 OU A DESSENSIBILIZAÇÃO DAS FIBRAS TRPV1-POSITIVAS REDUZIU A HIPERSENSIBILIDADE AGUDA MEDIADA PELO PAC

O antagonista TRPV1 SB-366791 (0,5 mg/kg, i.p) foi largamente capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia ao calor induzida por PAC, com valores de inibições de $100 \pm 20\%$ e $88 \pm 20\%$, respectivamente (Figura 5A e 5B). Quando a temperatura corporal dos animais foi observada após a administração do SB-366791 não foi detectado um

efeito hipertérmico (36.1 ± 0.5 e 35.8 ± 0.3 °C temperatura retal, para o grupo veículo ou SB-366791 1 hora após a administração, respectivamente; $P > 0.05$, Student's "t" test). Os animais do grupo veículo apresentaram valores basais de 35.5 ± 0.2 ; e os animais do grupo SB-366791 de 35.6 ± 0.3 °C, respectivamente (N de 6 animais por grupo).

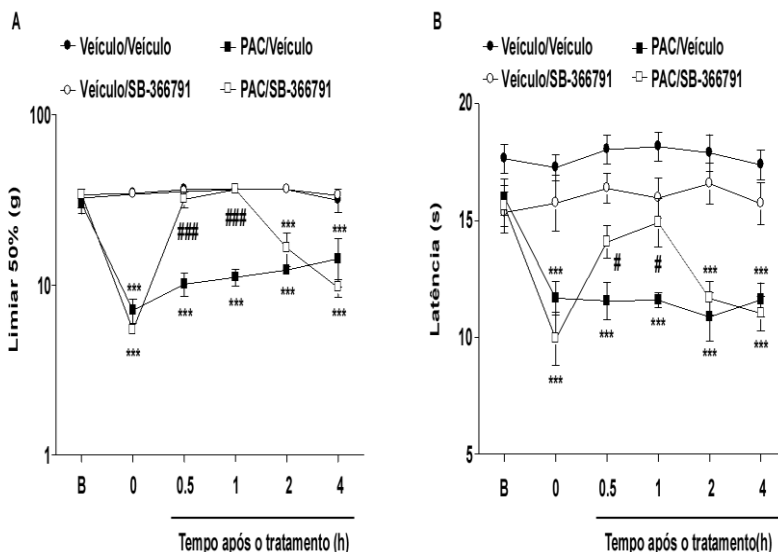


Figura 5 - O antagonista do receptor TRPV1 foi capaz de reduzir a alodinia mecânica e a hiperalgesia ao calor causada pelo paclitaxel (PAC).

Após a administração de SB-366791 (0,5 mg/kg; i.p) ou veículo (DMSO 0,1% em NaCl 0,9%; i.p) em ratos previamente injetados com PAC (1 mg/kg, i.p) ou veículo (NaCl a 0,9%; i.p). Os (A) limiares mecânicos e (B) a latência ao estímulo térmico ao calor foram observados 24 horas após a administração de PAC ou veículo. Os valores basais (descritos como B nos gráficos) foram determinados antes da administração, o ponto 0 representa os valores após 24 horas da injeção de PAC ou veículo. Os dados foram representados como a média \pm SEM para 6 animais. *** $P < 0,001$ quando comparado com animais tratados com veículo/veículo (em A e B); # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ quando comparado com os animais tratados com PAC/veículo, ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni.

De forma similar, a dessensibilização de fibras TRPV1-positivas causaram inibição da alodinia mecânica e da hiperalgesia ao calor induzida por PAC (85 ± 32 e 100% de inibição, respectivamente) (Figura 6A e 6B). Além disso, o protocolo de dessensibilização das fibras TRPV1-positivas foi capaz de diminuir a imunorreatividade para

o receptor de TRPV1 em amostras de GRD de ratos tratados com RTX quando comparado com o grupo tratado com veículo (redução de $45 \pm 3\%$) (Figura 6C).

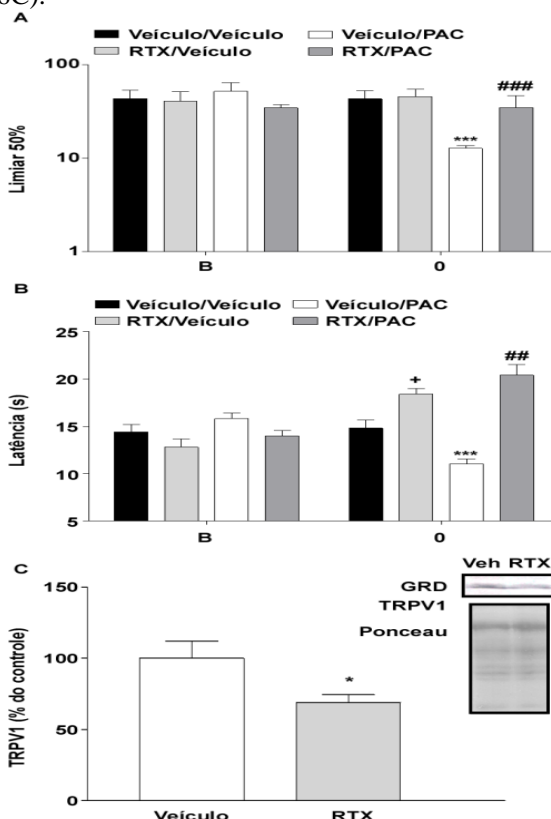


Figura 6 - A dessensibilização de fibras TRPV1-positivas foi capaz de prevenir o desenvolvimento da alodinia mecânica e da hiperalgesia ao calor causada pelo paclitaxel (PAC).

A alodinia mecânica (A) ou hiperalgesia ao calor (B) foi observada 24 horas após a injeção PAC (1 mg/kg, i.p) ou veículo (NaCl 0,9%; i.p), em animais injetados 7 dias antes com resinerferatoxina (RTX, 200 µg/kg; subcutâneo, s.c.) ou veículo (10% de etanol, 10% de Tween 80 em NaCl 0,9%; 1 ml/kg). A imunorreatividade ao receptor TRPV1 foi observada em amostras de gânglio da raiz dorsal (GRD, C) 7 dias após a injeção de RTX ou veículo. Os resultados de Western blot foram expressos como unidades arbitrárias de densidade. As bandas de proteína marcadas com ponceau são representativas que demonstram carga igual de proteína. Os valores basais (descritos como B nos gráficos) foram determinados antes da administração, o ponto 0 representa os valores após 24 horas da injeção de PAC ou veículo. Os dados foram representados como a média \pm SEM, para 6 animais ou 4 amostras. ***P < 0,001 quando comparado com animais tratados com veículo/veículo (em A e B); +P < 0,05

em relação aos valores basais (em B); ##P <0,01, ###P<0,001 quando comparado com os animais tratados com PAC/veículo (em A ou B), ANOVA de duas vias seguida por teste post-hoc de Bonferroni. *P<0,05 quando comparado com animais tratados com veículo (em C), teste "t" de Student.

4.3 A ADMINISTRAÇÃO DE PAC INDUZIU HIPERSENSIBILIDADE A CAPSAICINA E CAUSOU AUMENTO DA IMUNORREATIVIDADE AO RECEPTOR TRPV1

A medida que o receptor de TRPV1 parece estar envolvido na hipersensibilidade observada após a injeção aguda de PAC, então, resolvemos investigar a expressão do canal TRPV1 e a funcionalidade deste receptor após a injeção aguda de PAC. Assim, a injeção intraplantar de capsaicina (0,01 nmol/sítio) causou nocicepção de curta duração no grupo controle (tratados 24 horas antes com o veículo do PAC), mas causou uma nocicepção intensa nos animais previamente tratados com PAC (Fig. 7A). Também, a administração de PAC causou um aumento na imunorreatividade do receptor TRPV1 em amostras de GRD e de nervo ciático, com aumento de 2,5 vezes de aumento, em ambos os casos, 24 horas após a administração do PAC, em comparação com a administração de veículo (Fig. 7B e 7C).

A administração de PAC aumentou o número de neurônios TRPV1 positivos e a intensidade de fluorescência no GRD (L3-L5) (Fig. 8). Após 24 horas da administração de PAC o número de neurônios TRPV1 positivos de pequeno diâmetro (diâmetro menor que 30 μ M) aumentou em $27 \pm 3\%$ (Fig. 8B), e também a intensidade da fluorescência teve um aumento significativo (Fig. 8C).

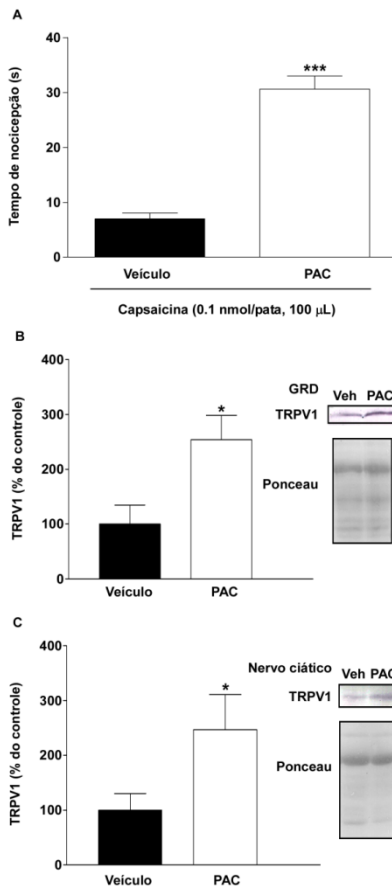
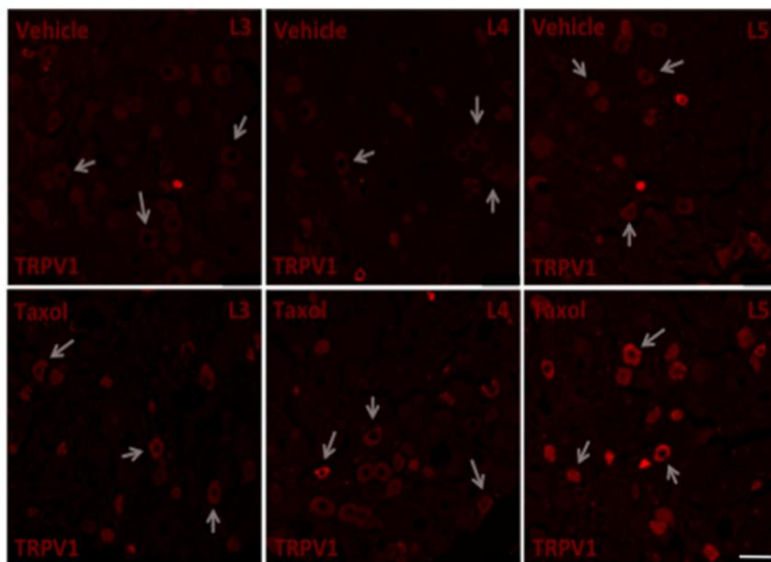
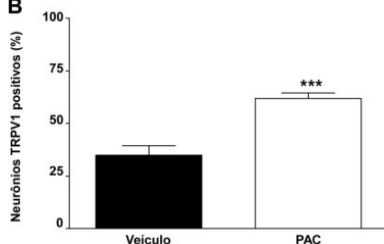


Figura 7 - A administração de PAC induziu hipersensibilidade a capsaicina e aumentou a imunoreatividade do receptor TRPV1 no GRD e nervo ciático. (A) A injeção subcutânea de capsaicina (0,01 nmol/pata; 100 μ L) foi realizada sob a superfície dorsal da pata traseira direita (intraplantar, i.pl.) 24 horas após injeção de paclitaxel (PAC, 1 mg/kg; i.p) ou veículo (NaCl 0,9%; i.p). Os dados foram representados como a média \pm S.E.M. para 5-6 animais. ***P <0,001; quando comparado com animais tratados com veículo, teste "t" de Student. O teste de Western blot mostrou a imunoreatividade ao receptor TRPV1 em (B) GRD ou (C) amostras de nervo ciático retiradas 24 horas após o tratamento com PAC (1 mg/kg, i.p) ou veículo (n=4). Os resultados de Western blot foram expressos como unidades arbitrárias de densidade. As bandas de proteína marcadas de ponceau são representativos que demonstram carga igual de proteína.

A



B



C

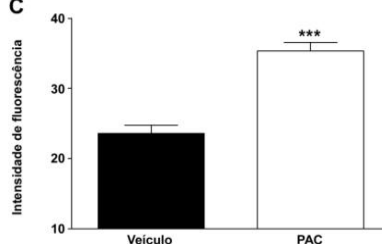


Figura 8 - A administração de paclitaxel (PAC) aumentou o número de neurônios TRPV1 positivos e a imunoreatividade para o receptor TRPV1 no GRD. (A) Imagem representativa da imunoreatividade (imunofluorescência) para o receptor TRPV1 (em vermelho) no GRD (L3, L4 e L5). Indicação de neurônios com marcação positiva para o receptor TRPV1 (flechas). A escala indica 25 μ m. Podemos observar que nos animais tratados com veículo (NaCl 0,9%; i.p) a imunofluorescência para o receptor TRPV1 está reduzida. A administração de PAC (1 mg/kg; i.p, após 24 horas) causou aumento no (B) número de neurônios TRPV1 positivos e na (C) intensidade de imunofluorescência para este receptor observados no GRD (L3-L5). A intensidade de fluorescência e a contagem dos neurônios TPV1 positivos foram observados em neurônios de pequeno diâmetro (menor que 30 μ m). Os dados foram representados como a média \pm S.E.M. para 5-6 animais. ***P < 0,001; quando comparado com animais tratados com veículo, teste "t" de Student.

4.4 O INFLUXO DE CÁLCIO MEDIADO PELO RECEPTOR TRPV1 É AUMENTADO APÓS A EXPOSIÇÃO AO PAC

Finalmente, nós investigamos o efeito da incubação com PAC (50 μ M) ou veículo nas correntes de influxo de cálcio mediadas pela capsaicina (500 nM) um agonista TRPV1 em neurônios do GRD em cultura. Foi observado que a exposição prévia ao PAC (24 horas) causou um aumento na corrente de Ca^{2+} transitória induzida pela capsaicina (Fig. 6A e 6B). A amplitude do pico de capsaicina foi de $1.840 \pm 216\%$ acima dos valores basais quanto exposto ao PAC, enquanto que em neurônios tratados com veículo foi de $780 \pm 136\%$ ($P < 0,05$) (Fig. 6B). Além disso, avaliou-se o efeito do PAC na porcentagem de neurônios que responderam a capsaicina dentro de uma população que era sensível ao KCl 30 mM. Também, a exposição ao PAC aumentou o número de células que respondem a capsaicina (78%, $n=101$) em relação ao grupo controle (49%, $n=81$; $P < 0,01$). Em conjunto, estes dados sugerem que o PAC poderia aumentar a intensidade do influxo de cálcio mediado pela capsaicina e o número de neurônios responsivos a capsaicina em neurônios do GRD.

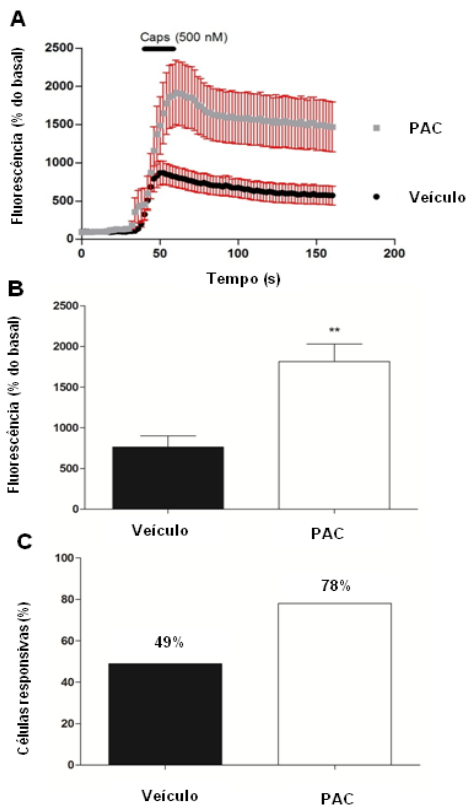


Figura 9 - Sensibilização do receptor TRPV1 e aumento do número de neurônios responsivos a capsaicina após a exposição ao paclitaxel (PAC) em neurônios do GRD. (A) Imagem representativa do influxo de cálcio mediado pela capsaicina (Caps, 500 nM) em neurônios do GRD expostos ao veículo (preto) ou PAC (50 μ M, cinza) por 24 horas. A aplicação de capsaicina (500 nM) é indicada pela barra horizontal. Os pontos representam média + SEM de níveis normalizados de fluorescência das células analisadas. (B) A fluorescência em relação ao basal foi aumentada em neurônios expostos ao PAC em relação aos expostos ao veículo. As barras representam média + S.E.M. (* $P < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni). (C) Porcentagem de células que mostraram resposta a capsaicina e que eram também responsivas ao KCl 30 mM (indicando viabilidade neuronal), neurônios exposto ao PAC (n=101) ou ao veículo (n=85).

Sensibilização do receptor TRPV1 e aumento do número de neurônios responsivos a capsaicina após a exposição ao paclitaxel (PAC) em neurônios do GRD. (A) Imagem representativa do influxo de cálcio mediado pela capsaicina (Caps, 500 nM) em neurônios do GRD expostos ao veículo (preto) ou PAC (50 μ M, cinza) por 24 horas. A

aplicação de capsaicina (500 nM) é indicada pela barra horizontal. Os pontos representam média + SEM de níveis normalizados de fluorescência das células analisadas. (B) A fluorescência em relação ao basal foi aumentada em neurônios expostos ao PAC em relação aos expostos ao veículo. As barras representam média + S.E.M. (* $P < 0,05$; ANOVA de uma via seguida de Bonferroni). (C) Porcentagem de células que mostraram resposta a capsaicina e que eram também responsívas ao KCl 30 mM (indicando viabilidade neuronal), neurônios exposto ao PAC (n=101) ou ao veículo (n=85).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a participação do receptor TRPV1 em um modelo de síndrome de dor aguda induzida por PAC em ratos, com a intenção de promover indicativos para o tratamento desta forma de dor. Os resultados obtidos neste projeto indicaram através de metodologias farmacológicas e moleculares, que o receptor TRPV1 poderia estar envolvido na hipersensibilidade aguda causada pela administração de PAC em ratos. Os dados obtidos indicam que este canal estaria sensibilizado e também com maior expressão no nervo ciático e GRD após a administração aguda de PAC, mecanismos que poderiam contribuir para a nocicepção aguda observada neste modelo.

A dor causada pelo uso de quimioterápicos é um sintoma comum para diversos compostos utilizados na clínica como a vincristina, a cisplatina, a oxaliplatina e o PAC (Sisignano et al., 2014). Dessa forma, esta modalidade de dor é uma das principais preocupações, relacionadas aos efeitos adversos da quimioterapia, quando os pacientes com câncer necessitam de tratamento utilizando estes compostos (Quasthoff e Hartung, 2002). Na terapia quimioterápica do PAC cerca de 56-69 % dos pacientes desenvolvem neuropatia sensorial que se manifesta como dormência, formigamento e dor em queimação (Loprinzi et al., 2011). Diferentes grupos de medicamentos, como os opioides, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes têm sido utilizados para o tratamento desta patologia dolorosa, porém sem eficácia considerável e apresentando diversos efeitos adversos (Piccolo e Kolesar, 2014).

Também, a síndrome de dor aguda induzida por PAC é um efeito adverso importante na clínica, e ainda não é tratada adequadamente, e poucos estudos sobre os seus mecanismos foram desenvolvidos até o momento (Garrison et al., 2003; Loprinzi et al., 2007; Loprinzi et al., 2011; Pachman et al., 2011; Reeves et al., 2012). Assim, a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na síndrome de dor aguda causada por PAC é importante, e poderia também auxiliar na descoberta de novos tratamentos para esta patologia. Além disso, como a dor aguda está relacionada com o aparecimento e severidade da dor neuropática observada após o tratamento com PAC em pacientes, a investigação dos mecanismos envolvidos na fase aguda poderia auxiliar na redução da intensidade, incidência ou ainda na prevenção desta forma de dor crônica (Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012).

Nos primeiros estudos clínicos envolvendo a dor aguda causada por PAC esta forma de dor era descrita como mialgias/artralgias

causadas por PAC, indicando que possivelmente este fármaco estaria causando alguma lesão nos tecidos musculares ou articulares dos pacientes (Garrison et al., 2003). Porém, foi observado que o PAC não causa dor devido a lesão muscular e possivelmente este quimioterápico estaria induzindo hipersensibilidade sensorial devido a sensibilização dos nociceptores (Loprinzi et al., 2007). A dor aguda causada pela administração de paclitaxel é causa comum de redução da qualidade de vida e morbidade nestes pacientes, e apresenta uma incidência de cerca de 88% quando do uso agudo no primeiro ciclo de tratamento (Saibil et al., 2010; Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012). Dessa forma, esta modalidade de dor antes descrita como mialgias/altragias causadas pela administração de PAC, hoje é chamada de síndrome de dor aguda induzida por paclitaxel (Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012).

Inicialmente, diversos estudos indicaram que a injeção de PAC em roedores poderia causar dor neuropática, o que foi associado com o desenvolvimento de alodínia mecânica e hiperalgesia ao calor (Polomano et al., 2001; Flatters et al., 2006; Chen et al., 2011), mas a avaliação e descrição do modelo de síndrome de dor aguda em ratos ainda não era explorada. Dessa forma, inicialmente para estudar os mecanismos envolvidos nesta patologia foi necessário caracterizar esta forma de dor utilizando modelos de síndrome de dor aguda causada por PAC em roedores (Dina et al., 2001; Rigo et al., 2013; Yan et al., 2015).

Observando que a síndrome dolorosa aguda causada pelo tratamento com PAC em humanos está associada com a sensação de dor espontânea, alodínia mecânica e dor em queimação e também os sintomas são descritos principalmente em membros inferiores (Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012), neste estudo foram observados os limiares para estímulos mecânicos ou térmicos de ratos na pata traseira direita. Em primeiro lugar, observou-se que o PAC causa hipersensibilidade aguda 24 e 48 horas após uma única injeção em ratos, um efeito semelhante foi anteriormente observado após a injeção de PAC em ratos (Rigo et al., 2013). Outros estudos mostraram que a administração aguda de PAC causa hipersensibilidade cerca de 1 a 6 horas após a administração, porém nestes casos a injeção deste composto foi realizada por via intravenosa e não intraperitoneal, e também em diferente dosagem (2 ou 5 mg/kg) (Yan et al., 2015), ou ainda em uma linhagem diferente de ratos (Dina et al., 2001). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que em ratos machos Wistar a administração aguda de PAC na dose de 1 mg/kg (intraperitoneal) foi capaz de induzir hiperalgesia 24 horas após a

administração (Rigo et al., 2013), resultados que foram também identificados no presente projeto.

A dor aguda associada ao PAC observada em pacientes é normalmente descrita como tendo seu aparecimento cerca de 1 a 3 dias após o primeiro ciclo de tratamento e normalmente se resolve após cerca de 7 dias (Loprinzi et al., 2007; Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012). O desenvolvimento de nocicepção aguda em ratos descrita neste projeto após a administração única de PAC teve início após 24 horas e se resolveu 72 horas após a administração. Em humanos temos o desenvolvimento de dor por maior período de tempo porém a dosagem é normalmente maior, cerca de 175 mg/m^2 no primeiro ciclo, sendo assim esta discrepância em relação a duração da dor pode ter ocorrido devido a dose e também a metabolização diferenciada do PAC em humanos e ratos (Yan et al., 2015). A dosagem de 1 mg/kg em ratos equivale a cerca de $7,03 \text{ mg/m}^2$ e foi a utilizada porque estudos prévios utilizaram esta dose em modelos de dor aguda (Rigo et al., 2013) e crônica (Polomano et al., 2001) causada por paclitaxel.

O desenvolvimento de dor aguda após o tratamento com PAC muitas vezes requer tratamento farmacológico para que os pacientes sejam capazes de suportar a quimioterapia e não desistam do tratamento com este quimioterápico nos próximos ciclos de tratamento (Scripture et al., 2006; Windebank e Grisold, 2008; Tay e Ho, 2009). Assim quando os pacientes apresentam dor logo após os primeiros dias de tratamento com PAC, são tratados com analgésicos, anti-inflamatórios, corticosteroides e opioides (Loprinzi et al., 2007; Loprinzi et al., 2011). Porém, nenhum desses tratamentos mostrou-se verdadeiramente eficaz nesta síndrome de dor aguda induzida pelo PAC e praticamente todos os medicamentos provocam os seus próprios efeitos colaterais, e ainda nenhum fármaco foi desenvolvido para prevenir o desenvolvimento da dor aguda e neuropática (Rowinsky et al., 1993; Wasserheit et al., 1996; Gordon et al., 1997; Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012). Dessa maneira, a descoberta de novos mecanismos moleculares envolvidos nesta condição dolorosa pode ser muito interessante, e pode ajudar no tratamento de perturbações neurológicas induzidas pela síndrome dolorosa aguda causada por PAC.

Diversos alvos moleculares foram estudados como mecanismos relevantes para a dor neuropática causada por quimioterápicos, como o PAC (Sisignano et al., 2014). Dentre estes alvos podemos citar os receptores TRP, como o receptor TRPV1, que foi indicado como um possível mediador da dor neuropática causada por PAC em ratos (Chen et al., 2011; Hara et al., 2013; Li et al., 2015), no entanto, a participação

desse receptor na síndrome dolorosa aguda induzida por PAC ainda não foi estudada. O TRPV1 é um canal iônico não seletivo a cátions, que é considerado como um importante transdutor de estímulos nocivos de diferentes modalidades, como o calor nocivo (mais de 43 °C) (Liedtke et al., 2007; Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Este canal é amplamente expresso no sistema nervoso periférico principalmente em fibras peptidérgicas, onde estaria envolvido na liberação de neuropeptídeos inflamatórios, causando inflamação neurogênica (Rosenbaum et al., 2010; Julius, 2013). Neste estudo, observou-se que a administração de um antagonista do receptor TRPV1 (SB-363791) reduziu de forma efetiva a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica causada por PAC. Este é o primeiro indicativo que um antagonista TRPV1 poderia reduzir a nocicepção aguda induzida por PAC. Outros estudos que avaliaram a participação do receptor TRPV1 na dor neuropática causada por PAC e utilizaram a administração de antagonistas TRPV1 observaram efeito antinociceptivo por via intratecal (Li et al., 2015) ou subcutânea (Hara et al., 2013) destes compostos. O estudo de Li e colaboradores (2015) também observou que a administração preventiva de um antagonista TRPV1 (via intratecal) poderia reduzir o aparecimento de nocicepção causada por paclitaxel, um efeito que é relevante na clínica onde poderia reduzir a incidência desta forma de dor.

Anteriormente, diversos estudos mostram que antagonistas TRPV1 possuem efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória ou de dor neuropática em roedores (Kitagawa et al., 2013; Lima et al., 2014; Uchytlova et al., 2014). Assim, estes compostos têm sido descritos como uma classe promissora de drogas analgésicas (Wong et al., 2009; Ferrer-Montielet et al., 2012; Goldmann et al., 2015), no entanto o desenvolvimento de hipertermia grave, é um dos principais sintomas adversos que ainda reduzem a sua aplicação na clínica (Gavva et al., 2008; Moran et al., 2011; Ferrer-Montiel et al., 2012). Neste estudo, não foi observado o desenvolvimento de efeito hipertérmico causado pelo SB-366791, após administração oral única em ratos, mostrando que neste estudo utilizamos a dosagem de um antagonista sem efeitos adversos relacionados ao antagonismo do receptor TRPV1.

Os pacientes que desenvolvem síndrome de dor aguda pela administração de paclitaxel normalmente apresentam sintomas de hipersensibilidade mecânica e dor em queimação, e também dor espontânea (Loprinzi et al., 2007; Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012). Dessa forma, como no modelo de síndrome de dor aguda induzida por paclitaxel observamos o desenvolvimento de hiperalgesia

térmica ao calor, este é um indicativo relevante que o receptor TRPV1 poderia estar envolvido nesta patologia, pois este canal tem relevância no desenvolvimento deste tipo de sintoma (Cao, et al., 2013; Julius, 2013). O aparecimento de hiperalgesia ao calor não é o sintoma predominante descrito pelos pacientes, porém pode aparecer em conjunto com outros sintomas debilitantes como dor espontânea e hipersensibilidade mecânica (Loprinzi et al., 2007; Loprinzi et al., 2011; Reeves et al., 2012). O canal TRPV1 não é considerado um mecanotransdutor para estímulos dolorosos (Liedtke et al., 2007; Liu e Montell et al., 2015), porém em situações de dano tecidual este receptor poderia estar envolvido em mecanismos relacionados o aparecimento de hipersensibilidade mecânica e dor espontânea (Schumacher et al., 2010; Moran et al., 2011; Julius, 2013). Também, antagonistas do receptor TRPV1 foram descritos como potenciais agentes que poderiam reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica ao calor observada em diferentes modelos animais de nocicepção (Schumacher et al., 2010; Moran et al., 2011; Julius, 2013; Yan et al., 2015; Ta et al., 2010; Anand et al., 2010; Wu et al., 2013; Uchytlova et al., 2014; Zakir et al., 2012). Nos estudos que avaliaram a participação do receptor TRPV1 na neuropatia causada por PAC foi observado redução da hiperalgesia térmica (Hara et al., 2013) e da alodinia mecânica (Li et al., 2015) após a administração de antagonistas do receptor TRPV1.

O TRPV1 é ativado por substâncias irritantes derivadas de produtos naturais como a capsaicina e a RTX pode também ser sensibilizado por mediadores inflamatórios endógenos durante condições de dor inflamatória (Raisinghani et al., 2005; Rosenbaum et al., 2010; Uchytlova et al., 2014), ou ainda pode ser modulado em condições de dor neuropática (Chen et al., 2011; Hara et al., 2014). Para confirmar a participação do TRPV1 na síndrome dolorosa aguda induzida por PAC em ratos, foi utilizada uma estratégia farmacológica diferente utilizando a administração subcutânea de RTX para promover a dessensibilização das fibras TRPV1 positivas (Steiner et al., 2007). Esta forma de ferramenta farmacológica já foi utilizada em diversos estudos para confirmar a participação de fibras TRPV1 positivas em mecanismos de nocicepção aguda (Bölskei et al., 2010; Bishnoi et al., 2011) ou crônica (Lee et al., 2015; Brown et al., 2015). Dessa forma, foi realizado o protocolo experimental com RTX e após 7 dias da injeção do agonista TRPV1, os animais mostraram uma redução no desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulos mecânicos ou térmicos após 24 horas da administração de PAC. Já os animais administrados com veículo apresentam o desenvolvimento de

nociceção aguda após a administração do quimioterápico. Estes resultados confirmam o envolvimento das fibras TRPV1 positivas neste modelo de dor.

O efeito analgésico de agonistas do canal TRPV1, tais como capsaicina e RTX, é provocado principalmente pela desfuncionalização das fibras TRPV1 positivas peptidérgicas e também pela redução da expressão do receptor TRPV1 nestes terminais sensoriais (Pecze et al., 2009; Schumacher, 2010; Anand e Bley, 2011). Dessa forma, este mecanismo tem sido usado para induzir analgesia em diferentes condições dolorosas; incluindo dor neuropática e dor relacionada ao câncer (Schumacher, 2010; Anand e Bley, 2011; Derry et al., 2013). Aqui, observou-se também que o pré-tratamento com RTX reduziu a expressão do receptor TRPV1 no GRD de ratos (cerca de 45% de redução), mostrando o efeito desta substância sobre as fibras TRPV1 positivas periféricas que expressam este canal. Mesmo que a dessensibilização das fibras TRPV1 positivas tenha produzido uma redução de 45% da expressão do receptor TRPV1, ainda podemos observar uma redução significativa da alodinia mecânica e da hiperalgesia térmica causada por PAC. Os resultados obtidos estão de acordo com dados da literatura utilizando doses similares de RTX, onde a redução da imunoreatividade para o receptor TRPV1 foi de quase 50% (Gewehr et al., 2011, Klafke et al., 2012).

Porém, esta estratégia farmacológica (uso de agonistas TRPV1) não é interessante para a utilização em pacientes com dor aguda ou neuropática causada por PAC, porque a indicação de aplicação cutânea de capsaicina é usada apenas para síndromes dolorosas com hipersensibilidade localizada, como neuropatia diabética, neuropatia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e neuralgia pós herpética (Derry et al., 2013; Gaul e Resch, 2015; Javed et al., 2015). Sendo assim, não se conhece ainda os efeitos a longo prazo da dessensibilização periférica com o uso de agonistas TRPV1 em humanos e como isso poderia alterar o funcionamento do sistema nervoso periférico (Derry et al., 2013). Porém, devido ao seu papel de integrador de estímulos nocivos o bloqueio do TRPV1 utilizando antagonistas sem efeito hipertérmico oferece uma excelente oportunidade como intervenção terapêutica de forma sistêmica para a síndrome de dor aguda causada por PAC.

A administração de agonistas TRPV1, como a capsaicina, de forma subcutânea em humanos induz a uma sensação de dor em queimação, acompanhada de inflamação cutânea, possivelmente causada pela liberação de substância P e CGRP pelos terminais sensoriais

peptidérgicos (Simone e Ochoa, 1991; Gazerani et al., 2007; Nielsen et al., 2013). Dessa forma, a aplicação de capsaicina em humanos é considerado um modelo experimental de dor, e já foi evidenciada a ação analgésica de diferentes substâncias, como benzodiazepínicos (clonazepam) (Vuilleumier et al., 2013), morfina e pregabalina neste modelo (Wang et al., 2008). Também, a aplicação de capsaicina via subcutânea na pata de ratos e camundongos é um modelo experimental de nocicepção descrito em diferentes estudos (Kwak et al., 1998, Rossato et al., 2010; Hoffmeister et al., 2011), ou ainda produz dessensibilização após repetição da aplicação como a RTX (Foster et al., 2005; Ma et al., 2015). Normalmente a administração de capsaicina causa nocicepção espontânea, induzindo a comportamentos como lamber e bater a pata injetada, este comportamento foi descrito para ratos e camundongos, e possui duração curta (cerca de 5 minutos) (Li et al., 1999; Johanek et al., 2001; Saadé et al., 2002). Visto que, a nocicepção observada após a administração de capsaicina na pata de ratos é dose-dependente e já foi observado que as administrações de doses reduzidas de capsaicina não são capazes de induzir comportamentos nociceptivos diferentes do veículo da capsaicina (Saadé et al., 2002; Gilchrist et al., 1996; Hoffmeister et al., 2011). Sendo assim, neste projeto utilizamos a dose de 0,01 nmol/pata de capsaicina para demonstrar que em animais previamente injetados com paclitaxel esta dose sub-máxima do agonista TRPV1 poderia causar nocicepção, indicando dessa maneira o desenvolvimento de sensibilização do receptor. Esta estratégia farmacológica já foi descrita previamente para a participação da sensibilização do canal TRPV1 em outras formas de nocicepção (Eskander et al., 2015). Ainda, pacientes que apresentam dor neuropática e inflamatória também desenvolvem aumento da resposta a capsaicina (Aykanat et al., 2012).

Dessa maneira, foi observado neste projeto que a nocicepção aguda causada por PAC induz hiperalgesia química a capsaicina, mostrando que este receptor estaria sensibilizado ou ainda sua expressão poderia estar aumentada na periferia. Para demonstrar estes efeitos, inicialmente foi investigado neste estudo se a administração aguda de PAC poderia induzir o aumento da imunoreatividade deste receptor no GRD e nervo ciático pela técnica de western blot. Anteriormente, foi demonstrado que a expressão do receptor de TRPV1 foi aumentada em neurônios do GDR após a injeção PAC, mas em diferentes pontos de tempo e após a injeção múltipla de PAC em ratos (Hara et al., 2013, Liu et al., 2015). O aumento da expressão do receptor TRPV1 já foi relacionado com a indução de hipersensibilidade em outros modelos de

dor (Urano et al., 2012; Amaya et al., 2004, Yu et al., 2008). Com isso, o presente projeto demonstrou que a administração aguda de PAC também induz aumento da imunoreatividade do receptor TRPV1 em GRD e nervo ciático de ratos. Também, foi demonstrado que a expressão do TRPV1 foi aumentada no GRD principalmente em neurônios de pequeno diâmetro (aumento da fluorescência), e também observamos um aumento do número de neurônios que expressam o TRPV1 (número de neurônios marcados). Estes resultados estão de acordo com a literatura que mostra que a administração repetida de paclitaxel poderia aumentar o número de neurônios TRPV1 positivos de pequeno diâmetro (Hara et al., 2013; Li et al., 2015).

No entanto, o aumento na expressão de determinado receptor não indica também aumento de atividade ou sensibilização deste canal. Para isso, foi necessário demonstrar que o PAC poderia também modificar a resposta a um agonista TRPV1. Previamente, já foi demonstrado que a oxaliplatina poderia provocar um aumento da resposta a capsaicina, e foi descrito que isso poderia induzir uma sensibilização do canal o que poderia provocar a hipersensibilidade a este quimioterápico quando administrado em animais (Anand et al., 2010). Neste estudo, observamos de forma similar que o PAC poderia aumentar a amplitude da resposta a capsaicina e o número de neurônios responsivos a capsaicina em cultura de GRD. Recentemente, observou-se que o PAC poderia aumentar o influxo de cálcio em cultura de GRD de ratos, porém o protocolo experimental foi diferente daquele realizado neste experimento, sendo que os neurônios foram retirados de animais previamente tratados com PAC (doses repetidas em 4 dias de administração, 2 mg/kg; i.p.) ou veículo (Liu et al., 2015). Neste estudo, realizamos a técnica de influxo de cálcio em GRD expostos ao PAC ou veículo em cultura por 24 horas e após estas células foram expostas ao agonista TRPV1 (capsaicina, 500 nM). Porém, observamos resultados similares aos já publicados (Liu et al., 2015), e estes dados corroboram os observados da imunofluorescência, porque além de um aumento de expressão também podemos observar um aumento do número células expressando o receptor. Todos estes eventos poderiam auxiliar no desenvolvimento de hipersensibilidade quando da administração do PAC em ratos, indicando a importância deste canal para o desenvolvimento da síndrome de dor aguda em pacientes.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A administração da dose única de PAC induziu nocicepção aguda (alodinia mecânica e hiperalgesia térmica) em ratos, caracterizando o modelo de síndrome de dor aguda associada ao PAC.

2. O tratamento sistêmico com o antagonista do receptor TRPV1 (SB-366791) foi capaz de reduzir a hipersensibilidade mecânica e térmica causada pela administração de PAC em ratos, mostrando a participação deste receptor neste modelo de dor.

3. A dessensibilização das fibras TRPV1-positivas reduziu a hipersensibilidade aguda mediada pelo PAC em ratos, dessa forma, podemos concluir que a nocicepção aguda causada por PAC depende das fibras sensoriais periféricas que expressam o receptor TRPV1.

4. A administração de PAC induziu hipersensibilidade a capsaicina e causou aumento da imunorreatividade ao receptor TRPV1. Assim, a nocicepção aguda causada por PAC poderia ser causada pelo aumento da expressão do receptor TRPV1 em neurônios periféricos nociceptivos.

5. O influxo de cálcio mediado pelo receptor TRPV1 é aumentado após a exposição ao PAC no GRD, mostrando que o receptor TRPV1 estaria também sensibilizado após a aplicação de PAC.

Concluindo, os nossos dados mostraram que a síndrome de dor aguda observada após a injeção de PAC em ratos é mediada pela sensibilização e também o aumento da expressão de receptor de TRPV1. Estes resultados mostram que o canal TRPV1 pode ser considerado como um mecanismo relevante para o desenvolvimento da síndrome de dor aguda associada ao PAC. Dessa forma, estratégias terapêuticas poderiam ser desenvolvidas a partir do bloqueio do receptor TRPV1 para reduzir a dor aguda associada ao PAC.

REFERÊNCIAS

Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, Levine JD. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci*. 2004; 24(18):4444-52.

Amaya F., Shimosato G, Nagano M, Ueda M., Hashimoto S, Tanaka Y, Suzuki H, Tanaka M, 2004. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci*. 2004; 20(9):2303-10.

Anand P, Bley K, Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Br J Anaesth*. 2011; 107(4):490-502.

Anand U, Otto W. R., Anand P. Sensitization of capsaicin and icilin responses in oxaliplatin treated adult rat DRG neurons. *Mol Pain*. 2010; 24(6):82.

Ashburn MA, Staats PS. Management of chronic pain. *Lancet*. 1999; 353(9167):1865-9.

Aykanat V, Gentall M, Briggs N, Williams D, Yap S, Rolan P. Intradermal capsaicin as a neuropathic pain model in patients with unilateral sciatica. *Br J Clin Pharmacol*. 2012; 73(1):37-45.

Barroso Batista J, A Sousa, Lourenço M, Bergman ML, Sobral D, Demengeot J, Xavier KB, Gordo I The first stages of adaptation of *Escherichia coli* to the intestine are dominated by mole scans *PLoS Genet*. 2014; 10(3):e1004182.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 2009; 139(2):267-84.

Bassols A, Bosch F, Baños JE. *J Pain Symptom Manage*. How does the general population treat your pain? Research in Catalonia, Spain 2002; 23(4):318-28.

Bishnoi M, Bosgraaf CA, Premkumar LS. Preservation of acute pain and efferent functions following intrathecal resiniferatoxin-induced analgesia in rats. *J Pain*. 2011; 12(9):991-1003.

ölskei K, Tékus V, Dezsi G, Szolcsányi J, Pethö L. Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat. *Eur J Pain*. 2010; 14(5):480-6.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol.* 2013; 716(1-3):61-76.

Brennan GP, Fritz JM, Hunter SJ. Impact of continuing education interventions on clinical outcomes of patients with neck pain who received physical therapy. *Phys Ther.* 2006; 86(9):1251-62.

Brown DC, Agnello K, Iadarola MJ. Intrathecal resiniferatoxin in a dog model: efficacy in bone cancer pain. *Pain.* 2015; 156 (6): 1018-24

Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100(1-2):131-4.

Cao E, Cordero-Morales JF, Liu B, Qin F, Julius D. TRP channels and pain. *Neuron.* 2013; 77(4): 667-79.

Castro-Junior CJ1, Milano J, Souza AH, Silva JF, Rigo FK, Dalmolin G, Cordeiro MN, Richardson M, Barros AG, Gomez RS, Silva MA, Kushmerick C, Ferreira J, Gomez MV. *Neuropharmacology.* 2013; 71:237-46.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997; 389 (6653): 816-24.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods.* 1994; 35 (1):55-63.

Chaplan SR, Pogrel JW, Yaksh TL. The role of subtypes dependent calcium channels voltage in Experimental Tactile allodynia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 269 (3):1117-23.

Chaplan SR, Eckert III WA, Carruters NI. In: Kruger L, Ligth AR, editors. *From Mouse to Man.* Boca Raton, FL: CRC PRESS; Translational Pain Researchy: 2010. Chapter 18.

Chen K, Zhang ZF, Liao MF, Yao WL, Wang J, Wang XR. Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord. *J Neurol Sci.* 2015; 352(1-2):62-7.

Chen Y., Yang C., Wang Z. J. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes

transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* 2011; 193:440-51.

Cliffer KD, Siuciak JA, Carson SR, Radley HE, Park JS, Lewis DR, Zlotchenko E, Nguyen T, Garcia K, Tonra JR, Stambler N, Cedarbaum JM, Bodine SC, Lindsay RM, DiStefano PS. Physiological characterization of Taxol-induced large-fiber sensory neuropathy in the rat. *Ann Neurol*. 1998; 43(1):46-55.

Cruvinel Wände M, Mesquita D Jr, Araújo JA, Catelan TT, de Souza AW, da Silva NP, Andrade LE Immune system - Part I. Fundamentals f innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50 (4):434-61.

Derry S, Sven-Rice A, Cole P, Tan T, Moore RA. Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; 2:CD007393.

Devor M. Unexplained Peculiarities of the dorsal root ganglion. *Pain*. 1999; (6):S27-35.

Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD. Role of protein kinase Cepsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*. 2001; 108 (3):507-15.

Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1980; 20:441-62.

Dougherty PM, Cata JP, Cordella JV, Burton A, Weng HR. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain*. 2004; 109 (1-2):132-42.

D Cunha J. “Personalizing” therapy for non-small cell lung cancer *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 22(2):118-20.

Eskander MA, Ruparel S, Green DP, Chen PB, Por ED, Jeske NA, Gao X, Flores ER, Hargreaves KM. Persistent Nociception Triggered by Nerve Growth Factor (NGF) Is Mediated by TRPV1 and Oxidative Mechanisms. *J Neurosci*. 2015; 35(22):8593-603.

Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A, Planells-Cases R, Fernández-Ballester G, González-Ros JM, Messeguer A, González-Muñiz R. Advances in modulating thermosensory TRP channels. *Expert Opin Ther Pat*. 2012; 22(9):999-1017.

Fishman SM. Recognizing pain management as a human right: a first step. *Anesth Analg*. 2007; 105(1):8-9.

Flatters SJ, Bennett GJ. Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*. 2006; 122(3):245-57.

Fornasari D. Mechanisms of pain in patients with chronic pain. *Clin drug investig*. *Clin Drug Investig*. 2012;32 Suppl 1:45-52.

Foster DC, Dworkin RH, Wood RW. Effects of intradermal foot and forearm capsaicin injections in normal and vulvodinia-afflicted women. *Pain*. 2005; 117(1-2):128-36.

Garrison JA1, McCune JS, Livingston RB, Linden HM, Gralow JR, Ellis GK, West HL. Myalgias and arthralgias associated with paclitaxel. *Oncology (Williston Park)*. 2003; 17(2):271-7;

Gauchan P, Andonh T, Ikeda K, Fujita M, Sasaki A, Kato A, Kuraishi Y. Biol Pharm Bull. Mechanical allodynia induced by paclitaxel, vincristine and oxaliplatin: gabapentin and different efficiency of expression of different alpha voltage gated calcium channel (2) delta subunit 1. 2009; 32(4):732-4.

Gauchan P, Andoh T, Kato A, Kuraishi Y. Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett*. 2009; 458(2):93-5.

Gavva NR. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29(11):550-7.

Gavva NR, Treanor JJ, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR., Kesslak JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C, Davar G. Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain*. 2008; 136(1-2):202-10.

Gazerani P1, Andersen OK, Arendt-Nielsen L. Site-specific, dose-dependent and sex-related responses to the experimental pain model induced by intradermal injection of capsaicin to the foreheads and forearms of healthy humans. *J Orofac Pain*. 2007; 21(4):289-302.

Gibbs GF, Drummond PD, Finch PM, Phillips JK. Unravelling the pathophysiology of complex regional pain syndrome: focus on sympathetically maintained pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008; 35(7):717-24.

Gilron I, Baron R, Jensen T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2015; 90(4):532-42.

Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain*. 1996; 67(1):179-88.

Gomes DA, Guatimosim C, Gomez RS, Leite MF, Vieira LB, Prado MA, Romano-Silva M.A, Gomez MV. Effect of halothane on the release of $[Ca^{2+}]_i$ in dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport*. 2004; 15(7):1187-90.

Grisold W1, Cavaletti G, Windebank AJ. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro Oncol.* 2012; 14 Suppl 4:iv45-54.

Hara T, Chiba T, Abe K, Makabe A, Ikeno S, Kawakami K, Utsunomiya I, Hama T, Taguchi K. Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain.* 2013; 154(6):882-9.

Hoffmeister C, Trevisan G, Rossato MF, de Oliveira SM, Gomez MV, Ferreira J. Role of TRPV1 in nociception and edema induced by monosodium urate crystals in rats. *Pain.* 2011; 152(8):1777-88.

Holzer P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 298:3-16.

Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action and selectivity for fine sensory neurons. *Pharmacol Rev.* 1991; 43(2):143-201.

Hunt SP, Mantyh PW. Molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(2):83-91.

Jaggi AS, Singh N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy *Toxicology.* 2012; 291(1-3):1-9.

Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gábor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature.* 1981; 29(5639):741-3.

Jara-Oseguerra A, Simon SA, Rosenbaum T. *Curr Mol Pharmacol.* TRPV1: One the road to pain relief. 2008; 1(3):255-69.

Johanek LM, Heitmiller DR, Turner M, Nader N, Hodges J, Simone DA. Cannabinoids attenuate capsaicin-evoked hyperalgesia through spinal and peripheral mechanisms. *Pain.* 2001; 93(3):303-15.

Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013; 29:355-84.

Kitagawa Y, Tamai I, Hamada Y, Usui K, Wada M, Sakata M, Matsushita M. Orally administered selective TRPV1 antagonist, JTS-653, attenuates chronic pain refractory to non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats and mice including post-herpetic pain. *J Pharmacol Sci.* 2013; 122 (2):128-37.

Klafke JZ1, da Silva MA, Trevisan G, Rossato MF, da Silva CR, Guerra GP, Villarinho JG, Rigo FK, Dalmolin GD, Gomez MV, Rubin MA, Ferreira J. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience.* 2012; 222:136-46.

Kohler DR, Goldspiel BR. Paclitaxel (taxol). *Pharmacotherapy.* 1994; 14(1):3-34.

Kwak JY, Jung JY, Hwang SW, Lee WT, Oh U. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. *Neuroscience*. 1998; 86(2):619-26.

Ledeboer A1, Jekich BM, Sloane EM, Mahoney JH, Langer SJ, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Johnson KW, Leinwand LA, Chavez RA, Watkins LR. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain Behav Immun*. 2007; 21(5):686-98.

Lee MG1, Lee DK, Huh BK, Choi SS, Kim HZ, Lim BG, Kim HS, Choi YS, Hur WS, Lee MK. The effect of clonidine pretreatment on epidural resiniferatoxin in a neuropathic pain rat model. *Acta Med Okayama*. 2015; 69(2):95-103.

Li J, Daughters RS, Bullis C, Bengiamin R, Stucky MW, Brennan J, Simone DA. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 mesylate blocks the development of hyperalgesia produced by capsaicin in rats. *Pain*. 1999; 81(1-2):25-33.

Li Y, Adamek P, Zhang H, Tatsui CE, Rhines LD, Mrozkova P, Li Q, Kosturakis AK, Cassidy RM, Harrison DS, Cata JP, Sapire K, Zhang H, Kennamer-Chapman RM, Jawad AB, Ghetti A, Yan J, Palecek J, Dougherty PM. The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4. *J Neurosci*. 2015; 35(39):13487-500.

Liedtke W1. TRPV channels' role in osmotransduction and mechanotransduction. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; (179):473-87.

Lima CK, Silva RM, Lacerda RB, Santos BL, Silva RV, Amaral LS, Quintas LE, Fraga CA, Barreiro EJ, Guimaraes MZ, Miranda AL. LASSBio-1135: a dual TRPV1 antagonist and anti-TNF-alpha compound orally effective in models of inflammatory and neuropathic pain. *PLoS One*. 2014; (6):e99510.

Ling B, Coudoré-Civiale MA, Balayssac D, Eschalier A, Coudoré F, Authier N. Behavioral and immunohistological assessment of painful neuropathy induced by a single oxaliplatin injection in the rat. *Toxicology*. 2007; 234(3):176-84.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*. 2008; 137(3):473-7.

Lohman D, Schleifer R, Amon JJ. Access to pain treatment as a human right. *BMC Med*. 2010;8:8.

Loprinzi CL, Maddocks-Christianson K, Wolf SL, Rao RD, Dyck PJ, Mantyh P, Dyck PJ. The Paclitaxel acute pain syndrome:

sensitization of nociceptors as the putative mechanism. *Cancer J.* 2007; 13(6):399-403.

Loprinzi CL, Reeves BN, Dakhil SR, Sloan JA, Wolf SL, Burger KN, Kamal A, Le-Lindqwister NA, Soori GS, Jaslowski AJ, Novotny PJ, Lachance DH. Natural history of paclitaxel-associated acute pain syndrome: prospective cohort study NCCTG N08C1. *J Clin Oncol.* 2011; 29(11):1472-8.

Mantyh PW. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(10):797-809.

Minke B. The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *J Neurogenet.* 2010; 24(4):216-33.

Moraes ER, Kushmerick C, Naves LA1. Characteristics of dorsal root ganglia neurons sensitive to Substance P. *Mol Pain.* 2014; 10:73.

Moran MM1, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10(8):601-20.

Nalamachu S. An overview of pain management: the clinical efficacy and value of treatment. *Am J Manag Care.* 2013; 19(14 Suppl):s261-6.

Nicolaou RK, Guy A. *Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995,34,2079.

Nicolaou KC. Inspirations discoveries and future perspectives in total synthesis. *J Org Chem.* 2009; 74(3):951-72.

Nielsen TA, da Silva LB, Arendt-Nielsen L, Gazerani P. The effect of topical capsaicin-induced sensitization on heat-evoked cutaneous vasomotor responses. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2013; 5(3):148-60.

Nieto FR1, Entrena JM, Cendán CM, Pozo ED, Vela JM, Baeyens JM. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain.* 2008; 137(3):520-31.

Novotny L, Szekeres T. Recent developments in cancer chemotherapy oriented towards new targets. *Expert Opin Ther Targets.* 2005; 9(2):343-57.

OMS – 2014. Pelo Instituto de Oncoguia. Equipe de oncoguia, data da última atualização: 24/04/2015.

Pacharinsak C, Beitz A. Animal models of cancer pain. *Comp Med.* 2008; 58(3): 220-33.

Pachman DR, Barton DL, Watson JC, Loprinzi CL. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 90 (3):377-87.

Page GG, Ben-Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC. Morphine attenuates surgery-induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain*. 1993; 54 (1):21-8.

Pecze L, Pelsoczi P, Kecskés M, Winter Z, Papp A, Kaszás K, Letoha T, Vizler C, Oláh Z. Resiniferatoxin mediated ablation of TRPV1+ neurons removes TRPA1 as well. *Can J Neurol Sci*. 2009; 36 (2): 234-41.

Peltier AC, Russell JW. Advances in understanding drug-induced neuropathies. *Drug Saf*. 2006;29(1):23-30.

Piccolo JI, Kolesar JM. Prevention and treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Am J Health Syst Pharm*. 2014; 71(1):19-25.

Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*. 2001; 94(3):293-304.

Plast, G. *The Best Democracy Money Can Buy*. Nova Iorque: Penguin Plume, 2003. 384 p.

Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol*. 2002; 249 (1):9-17.

Rang HP, Bevan S, Dray A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. *Br Med Bull*. 1991; 47(3):534-48.

Reeves BN, Dakhil SR, Sloan JA, Wolf SL, Burger KN, Kamal A, Le-Lindqwister NA, Soori GS, Jaslowski AJ, Kelaghan J, Novotny PJ, Lachance DH, Loprinzi CL. Further data supporting that paclitaxel-associated acute pain syndrome is associated with development of peripheral neuropathy: North Central Cancer Treatment Group trial N08C1. *Cancer* 2012; 118(20):5171-8.

Rigo FK, Dalmolin GD, Trevisan G, Tonello R, Silva MA, Rossato MF, Klafke JZ, Cordeiro Mdo N, Castro Junior CJ, Montijo D, Gomez MV, Ferreira J. Effect of ω -conotoxin MVIIA and $\text{Ph}\alpha 1\beta$ on paclitaxel-induced acute and chronic pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 114-115:16-22.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 2010; 401(2):318-20.

Rossato MF, Trevisan G, Walker CI, Klafke JZ, de Oliveira AP, Villarinho JG, Zanon RB, Royes LF, Athayde ML, Gomez MV, Ferreira J. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81(4):544-51.

Rowinsky EK, Eisenhauer EA, Chaudhry V, Arbuck SG, Donehower RC. Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol.* 1993; 20 (4 Suppl 3): 1-15.

Saadé NE, Massaad CA, Ochoa-Chaar CI, Jabbur SJ, Safieh-Garabedian B, Atweh SF. Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol.* 2002; 545 (Pt 1): 241-53.

Saibil S, Fitzgerald BRN. Dranitsaris, BPharm MSc § and M. Clemons, MB MD *Curr Oncol.* 2010; 17(4): 42–47. PMCID: PMC2913828

Sandra PS, Oger JM, Lagarce F, Couet W, Benoît JP. “Enhanced Oral Paclitaxel Bioavailability After Administration of Paclitaxel-Loaded Lipid Nanocapsules”. *Pharmaceutical Research.* 2006; 23(6):1243–1250.

Sakurada S, Chaki K, Watanabe H, Nakata N, Sakurada T, Kisara K, Suzuki K. Antinociceptive mechanisms of [D-Arg2]-dermorphin tripeptide analogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 263(2):793-9.

Sasamura T, Nakamura S, Iida Y, Fujii H, Murata J, Saiki I, Nojima H, Kuraishi Y. Morphine analgesia suppresses tumor growth and metastasis in a mouse model of cancer pain produced by orthotopic tumor inoculation. *Eur J Pharmacol.* 2002; 441(3):185-91.

Schumacher MA. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. *Pain Pract.* 2010; 10(3):185-200.

Scripture CD, Figg WD, Sparreboom A. The role of drug-metabolizing enzymes in clinical responses to chemotherapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2(1):17-25.

Siau C1, Xiao W, Bennett GJ. Paclitaxel- and vincristine-evoked painful peripheral neuropathies: loss of epidermal innervation and activation of Langerhans cells. *Exp Neurol.* 2006; 201(2):507-14

Simone DA, Ochoa J. Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans. *Pain.* 1991; 47(3):285-94.

Sisignano M1, Baron R2, Scholich K1, Geisslinger G1. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. *Nat Rev Neurol.* 2014; 10(12):694-707.

Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, Burmeister JJ, Oliveira DL, Roberts JL, Bannon AW, Norman MH, Louis JC, Treanor JJ, Gavva NR, Romanovsky AA. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *J Neurosci.* 2007; 27(28):7459-68.

Szolcsányi J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. *Prog Drug Res.* 2014; (68):1-37.

Tay W, Ho KY. The role of interventional therapies in cancer pain management. *Ann Acad Med Singapore.* 2009; 38(11):989-97.

Trevisan G, Rossato MF, Hoffmeister C, Oliveira SM, Silva CR, Matheus FC, Mello GC, Antunes E, Prediger RD, Ferreira J. Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV1 or TRPA1 stimulation of rat peritoneum. *Eur J Pharmacol.* 2013; 714 (1-3): 332-44.

Uchytlova E, Spicarova D, Palecek JI. TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms. *Mol Pain.* 2014; 10:67.

Urano H, Ara T, Fujinami Y, Hiraoka BY. Aberrant TRPV1 Expression in Heat Hyperalgesia Associated with Trigeminal Neuropathic Pain. *Int J Med Sci.* 2012; 9(8):690-7.

Varga A, Németh J, Szabó A, McDougall JJ, Zhang C, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neurosci Lett.* 2005; 385(2):137-42.

Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol.* 2009; 75(6):1262-79.

Vuilleumier PH, Besson M, Desmeules J, Arendt-Nielsen L, Curatolo M. Evaluation of anti-hyperalgesic and analgesic effects of two benzodiazepines in human experimental pain: a randomized placebo-controlled study. *PLoS One.* 2013; 8(3):e43896.

Wang H1, Bolognese J, Calder N, Baxendale J, Kehler A, Cummings C, Connell J, Herman G. Effect of morphine and pregabalin compared with diphenhydramine hydrochloride and placebo on hyperalgesia and allodynia induced by intradermal capsaicin in healthy male subjects. *J Pain.* 2008; 9(12):1088-95.

Wasserheit C1, Frazein A, Oratz R, Sorich J, Downey A, Hochster H, Chachoua A, Wernz J, Zeleniuch-Jacquotte A, Blum R, Speyer J. Phase II trial of paclitaxel and cisplatin in women with advanced breast cancer: an active regimen with limiting neurotoxicity. *J Clin Oncol.* 1996; 14(7):1993-9.

Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 2008; 13(1):27-46.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest.* 2010; 120(11):3742-4.

Wong GY, Gavva NR. Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Res Rev.* 2009; 60(1):267-77.

Xiao W, Boroujerdi A, Bennett GJ, Luo ZD. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy: analgesic effects of gabapentin and effects on expression of the alpha-2-delta type-1 calcium channel subunit. *Neuroscience.* 2007; 144(2):714-20.

Yan X, Maixner DW, Yadav R, Gao M, Li P, Bartlett MG, Weng HR. Paclitaxel induces acute pain via directly activating toll like receptor 4. *Mol Pain.* 2015; 11:10.

Yu L, Yang F, Luo H, Liu FY, Han JS, Xing GG, Wan Y. The role of TRPV1 in different subtypes of dorsal root ganglion neurons in rat. *Mol Dor.* 2008; 4:61.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983; 16(2):109-10.

ANEXOS

ANEXO A: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ INTERNO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPV1 NA HIPERALGESIA INDUZIDA POR PACLITAXEL EM RATOS"

Numero do Parecer: 107/2010

Pesquisador Responsável: Juliano Ferreira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CIETEA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadoras.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 13 de dezembro de 2010.

Marta Lizandra do Rêgo Leal
Coordenador do Comitê Interno de Ética em Experimentação
Animal-UFSM

ANEXO B: DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que se fizeram necessários que **REBECA NAMBUMBO LUACUTI** participou do Curso de Manipulação e Cuidados com Animais de Laboratórios – Módulos I, II, III e V, na modalidade presencial, promovido pela Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC e Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, realizado em 2015, com carga horária de 08 horas, ministrado pelos professores Vilson Heinzen Cardoso, Miriam Conceição Martins, Eduardo Pacheco Rico, Samira da Silva Valvassori e Jairo José Zocche.

Criciúma, 10 de maio de 2016.

Por ser verdade, firmamos o presente.


JAIRO JOSÉ ZOCHE
Coordenador da CEUA


Rebeca N. Luacuti